



Biosurveillance de la pollution de la lagune de Bizerte (Tunisie) par l'analyse comparée des niveaux de contamination et de l'écotoxicité des sédiments et du biote

Badreddine Barhoumi

► To cite this version:

Badreddine Barhoumi. Biosurveillance de la pollution de la lagune de Bizerte (Tunisie) par l'analyse comparée des niveaux de contamination et de l'écotoxicité des sédiments et du biote. Ecologie, Environnement. Université de Bordeaux; Université de Carthage (Tunisie), 2014. Français. NNT : 2014BORD0075 . tel-01133942

HAL Id: tel-01133942

<https://theses.hal.science/tel-01133942>

Submitted on 20 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITE DE CARTHAGE
FACULTE DES SCIENCES DE BIZERTE**

En cotutelle avec

**université
de BORDEAUX**

UNIVERSITE DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS

THESE

Présentée par

BARHOUMI BADREDDINE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN BIOLOGIE

Spécialité : Géochimie et Écotoxicologie

Intitulée

**Biosurveillance de la pollution de la lagune de Bizerte
(Tunisie) par l'analyse comparée des niveaux de
contamination et de l'écotoxicité des sédiments et du biote**

Soutenue le 10 / 06 / 2014, devant la commission d'examen formée de:

M. Ben Nasr Chérif	Professeur, FSB	Président
Mme Gomez Eléna	Professeur, Université Montpellier I	Rapporteur
M. Banni Mohamed	Maître de Conférences, ISBM	Rapporteur
Mme Miège Cécile	Dr Irstea, Lyon	Examineur
M. Cachot Jérôme	Professeur, Université de Bordeaux	Directeur de thèse
M. Driss Mohamed Ridha	Professeur, FSB	Directeur de thèse

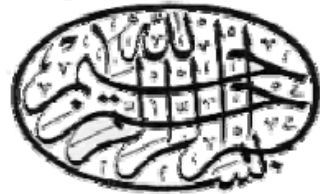


Je dédie cette thèse à mon père, **Hedi Barhoumi**, qui aurait été certainement le plus heureux en ce moment exceptionnel de ma vie. Malheureusement le seigneur l'a rappelé plus tôt. Où que tu sois, dans les cieux, je te dis infiniment merci, car sans toi je n'aurais jamais entamé un troisième cycle.

À toute ma famille

À tous ceux que j'aime et qui m'aiment,

Je dédis ce travail, fruit de patience et de persévérance.



وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى الْفُلْكَ مَوَازِيرَ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ (14) مِنْ سُورَةِ النَّحْلِ.

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Chimie Analytique Appliquée de la faculté des Sciences de Bizerte (Tunisie) en collaboration avec le Laboratoire Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux à l'Université de Bordeaux.

A l'issu de ces trois années de thèse, je tiens tout d'abord à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique – Tunisie pour avoir financé ce projet.

*Je tiens aussi à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie le Professeur **Chérif Ben Nasr** qui m'a fait l'honneur de présider le jury. Je remercie notamment Mme **Eléna Gomes** (Professeur) et M. **Mohamed Banni** (Maître de Conférences) qui se sont montrés disponibles pour rapporter cette étude. Merci également à Mme **Cécile Miège** (Dr Cemagref) qui a acceptée d'examiner ce travail.*

*Mes plus sincères remerciements vont ensuite à mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur **Mohamed Ridha Driss**, qui m'a permis de réaliser ce travail et qui m'a soutenue pendant ces 3 années. Il a su me guider et me faire partager ses connaissances de la phase expérimentale à la phase rédactionnelle. Il a toujours été à l'écoute de mes nombreuses interrogations et je le remercie vraiment pour tous.*

*Je suis également infiniment reconnaissante envers mon co-encadrant de thèse, Monsieur le Professeur **Jérôme Cachot**, qui m'a été d'un très grand soutien tout au long de mon travail de thèse. Toutes nos longues discussions sur les démarches analytiques et les tournures à prendre sur les publications et la rédaction du manuscrit m'ont vraiment été très bénéfiques. Je tiens aussi à lui exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'intégrant dans son*

laboratoire et pour son soutien dans les moments difficiles et merci pour ta confiance et l'autonomie que tu m'as laissée dès le début de mon travail. Trouver en ce mémoire toute ma reconnaissance; *MILLES MERCI MON PROFESSEUR*,

C'est avec de profonds sentiments de reconnaissance et un très grand respect que je remercie Madame le Professeur **Hélène Budzinski**, Directeur de l'équipe "LPTC" à l'Université Bordeaux 1, qui m'a accueilli dans son équipe. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires qui m'ont permis la finalisation de ma Thèse durant mes séjours à Bordeaux.

Je suis très redevable à Madame **Karyn LeMenach** et Monsieur **Laurent Peluhet**, Techniciens au Laboratoire "LPTC" qui ont m'a formée à l'extraction et la purification des échantillons biologiques et de sédiments.

J'adresse également mes remerciements au personnel de l'équipe Toxicologie:

- **Christelle Clérandeau** qui a guidé mes premiers pas dans le monde des biomarqueurs et qui a su rester disponible malgré ses occupations.
- **Laure Landi** et **Anaïk Pichon** pour leur aide précieuse dans le cadre des bioessais et pour leur gentillesse et leur chaleur humaine.

Mes remerciements vont également à Mr. **Pierre Anschutz** et Mr. **Dominique Poirier** qui m'ont permis de réaliser mes dosages d'ammonium dans les sédiments. Je remercie également Mr. **Henry Etcheber** de l'Equipe ECOBIOC de l'UMR EPOC qui m'a permis de réaliser mes dosages de métaux dans les sédiments.

Je tiens aussi à remercier Mr. **Walid Ben Ameer** (Doctorant Chercheur à la faculté des Sciences de Bizerte) pour leur précieuse aide durant les périodes d'échantillonnage.

Parmi ces remerciements, j'ai une pensée particulière pour mes collègues et tous les membres du laboratoire de Chimie Analytique Appliquée de la Faculté des Sciences de

Bizerte pour leur chaleureuse collaboration et pour l'atmosphère propice qu'ils ont su créer.

Enfin, j'aimerais bien adresser mes sincères remerciements à tous mes professeurs à la faculté des sciences de Bizerte auxquels je dois ma formation.

Résumé

L'objectif de cette thèse est le diagnostic de l'état de santé de la lagune de Bizerte par une approche multi-marqueurs (chimique, biochimique et morphométrique) et multi-compartiments (sédiment et biote). Pour atteindre cet objectif, les modèles biologiques choisis sont la moule *Mytilus galloprovincialis* et le poisson gobie *Zosterisessor ophiocephalus*. Ces deux espèces sont largement répandues dans la lagune de Bizerte et la mer Méditerranée. Dans une première partie et afin d'estimer les niveaux de contamination de la lagune de Bizerte par les polluants organiques persistants (POPs), des analyses chimiques, granulométriques et minéralogiques (COT) de sédiments superficiels ont été réalisées. Par la suite la toxicité potentielle des sédiments a été évaluée par une batterie de bioessais. Dans une troisième partie la biodisponibilité et l'impact écotoxicologique des POPs étudiés ont été évalués par l'accumulation de ces contaminants au niveau des deux organismes indicateurs choisis et l'étude des réponses biologiques associées à travers quelques biomarqueurs tels que la catalase (CAT), l'acide thiobarbiturique (TBARS); l'Ethoxyrésorufine O-dééthylase (EROD); la glutathion-S-transférase (GST) et l'acétylcholinestérase (AChE). Les principaux résultats des analyses chimiques révèlent une contamination générale des sédiments et organismes étudiés par les POPs. Les niveaux de contamination sont fonction de l'espèce et de la station étudiée. La comparaison de nos valeurs avec les données de la littérature a montré que les niveaux de contamination de la lagune sont similaires ou légèrement inférieurs à ceux enregistrés dans des écosystèmes équivalents dans d'autres pays du monde. L'estimation de la toxicité des sédiments au moyen des valeurs guides sédimentaires (ERL, ERM, TEL et PEL) et trois tests biologiques (Microtox[®], SOS-Chromotest[®] et test MELA) ont montré que les sédiments des stations du canal de Bizerte S1 et S3 représentent un danger accru pour les organismes aquatiques. Nos résultats ont montré que les biomarqueurs mesurés chez les deux espèces choisies sont des paramètres sensibles et inductibles permettant de qualifier l'état de santé des organismes et la qualité globale du milieu étudié. Les marqueurs morphométriques contrairement aux marqueurs biochimiques n'ont pas permis de discriminer les différents sites étudiés. Contrairement aux poissons, il a été démontré chez les moules que les facteurs abiotiques ont une influence sur les concentrations en POPs et les réponses des biomarqueurs.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, il apparaît que cette approche intégrative associant des mesures chimiques et écotoxicologiques représente un bon moyen pour évaluer la qualité de l'environnement notamment dans le cadre de programmes de biosurveillance.

Mots-clés: Biosurveillance, polluants organiques persistants, biodisponibilité, bioessais, gobie, moule méditerranéenne, espèces sentinelles, biomarqueurs, Lagune de Bizerte.

Abstract

The objective of this thesis was the diagnosis of the health status of the Bizerte lagoon using a multi-marker (chemical, biochemical and morphometric) and multi-compartment approach (sediment and biota). To achieve this objective, the selected biological models were the mussel *Mytilus galloprovincialis* and the goby fish *Zosterisessor ophiocephalus*. Both species are widespread in the Bizerte lagoon and the Mediterranean Sea. In a first part and in order to estimate the levels of contamination of the Bizerte lagoon, persistent organic pollutant (POPs), granulometric and mineralogical (TOC) analyses of surficial sediments were carried out. Afterwards, the potential toxicity of sediments was assessed by a battery of bioassays. In the third part, bioavailability and ecotoxicological impact of POPs studied were assessed by bioaccumulation measurement in these two indicator species, and the study of biological responses associated through a battery of biomarkers such as catalase (CAT), thiobarbituric acid (TBARS); Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD); glutathione-S-transferase (GST) and acetylcholinesterase (AChE). The main results of the chemical analyses show a general contamination of sediments and organisms studied by POPs. Contamination levels are dependent on the studied species and stations. Comparing our values with literature data, showed that the levels of contamination of the lagoon are similar or slightly lower than equivalent ecosystems in other parts of the world. Besides, the estimation of sediment toxicity, using sediment guideline values (ERL, ERM, TEL et PEL), as well as bioassays (Microtox®, SOS-Chromotest® and MELA test) showed that stations of canal of Bizerte S1 and S3 were associated with an increased hazard to aquatic organisms. Our results showed that biomarkers measured in both selected species are sensitive and inducible parameters, which allowed to characterize the health status of organisms and global quality of the studied environment. Biochemical but not morphometric markers allowed to discriminate the different studied sites according to chemical risk. Unlike fish, it has been demonstrated in mussels that abiotic factors influence the concentrations of POPs and biomarker responses.

Obtained data suggest that integrative approach, combining chemical and ecotoxicological measurements, may represent a good way to assess the quality of the environment, particularly, in the context of biomonitoring programs.

Keywords: Biomonitoring, persistent organic pollutants, bioavailability, bioassays, goby, Mediterranean mussel, sentinel species, biomarkers, Bizerte lagoon.

TABLE DES MATIERS

REMERCIEMENTS

RESUME

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS ET NOTATIONS

INTRODUCTION GENERALE.....1

CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Présentation du site d'étude: la lagune de Bizerte9

I.1 Présentation générale..... 9

I.2 Cadre climatique 10

I.3 Activités anthropiques autour de la lagune de Bizerte 10

I.3.1 Exploitation des ressources naturelles 10

I.3.2 Urbanisation et développement des activités industrielles et agricoles 11

I.4 Sédimentologie et courantologie de la lagune de Bizerte..... 13

II. Les contaminants organiques et métalliques dans l'environnement aquatique15

II.1 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)..... 15

II.1.1 Structure chimique 15

II.1.2 Propriétés physico-chimiques..... 16

II.1.3 Principales sources d'émission..... 19

II.1.3.1 Sources naturelles..... 19

II.1.3.2 Sources anthropiques..... 19

II.1.4 Caractérisation des sources de HAP 20

II.1.5 Toxicité des HAP 21

II.1.5.1 Toxicité aiguë 22

II.1.5.2 Toxicité chronique 23

II.1.6 Approche par les Facteurs d'Equivalence Toxique (TEF)	24
II.1.7 Réglementations	25
II.2 Les polychlorobiphényles (PCB)	28
II.2.1 Structures chimique et nomenclature	28
II.2.2 Propriétés physico-chimiques.....	30
II.2.3 Sources de pollution	32
II.2.4 Toxicité.....	32
II.2.4.1 Toxicité aigue	33
II.2.4.2 Toxicité chronique	34
II.2.5 Approche par les Facteurs d'Equivalence Toxique (TEF)	34
II.2.6 Réglementations	35
II.3 Les Polybromodiphényles éthers (PBDE)	36
II.3.1 Structure chimique et nomenclature	37
II.3.2 Propriétés physico-chimiques.....	37
II.3.3 Sources	38
II.3.3.1 Utilisation	38
II.3.3.2 Volume produit	39
II.3.4 Toxicité.....	39
II.3.4.1 Toxicité aigue	39
II.3.4.2 Toxicité chronique	39
II.3.5 Réglementations	40
II.4 Les Pesticides Organochlorés (OCP)	40
II.4.1 Généralités.....	40
II.4.2 Propriétés physico-chimiques.....	41
II.4.3 Classification	43
II.4.3.1 Les dérivés aromatiques.....	43
II.4.3.2 Les dérivés alicycliques	44
II.4.3.2.1 Les dérivés du cyclopentadiène	44
II.4.3.2.2 Les dérivés cyclaniques.....	45
II.4.4 Toxicité des OCP	46
II.4.4.1 Les intoxications aiguës.....	46
II.4.4.2 Les intoxications chroniques.....	47
II.4.5 Réglementations	47
II.5 Les éléments traces métalliques.....	48
II.5.1 Sources.....	48

II.5.2 Caractéristiques physico-chimiques	49
II.5.3 Toxicité.....	52
II.5.4 Spéciation et biodisponibilité	53
II.6 Distribution et devenir des polluants (HAP, PCB, PBDE, POC et métaux) dans les écosystèmes	55
II.7 Bioconcentration, bioaccumulation et bioamplification des polluants.....	63
II.8 Métabolisation des micropolluants.....	65
II.8.1 Métabolisation des HAP	66
II.8.2 Métabolisation des PCB	69
II.8.3 Métabolisation des PBDE.....	70
II.8.4 Métabolisation des OCP.....	71
III. Evaluation de la qualité des sédiments.....	71
III.1 Indicateurs chimiques	72
III.2 Indicateurs Ecotoxicologiques	72
III.2.1 Bioessais sur sédiment	72
III.2.2 Biomarqueurs biochimiques	74
III.2.2.1 L'activité acétylcholinestérase (AChE).....	75
III.2.2.2 L'activité éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD).....	77
III.2.2.3 L'activité glutathion-S-transférase (GST)	78
III.2.2.4 L'activité catalase (CAT).....	78
III.2.2.5 Les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)	79
III.3 Approches intégrées.....	79
IV. Les modèles biologiques étudiés.....	80
IV.1 La moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>.....	80
IV.1.1 Répartition géographique et systématique	80
IV.1.2 Ecologie.....	81
IV.1.3 Anatomie et physiologie.....	82
IV.1.4 Utilisation en tant qu'espèce sentinelle	83
IV.2 Le poisson Gobie <i>Zosterisessor ophiocephalus</i>.....	84
IV.2.1 Répartition géographique et systématique	84
IV.2.2 Ecologie.....	84
IV.2.3 Espèce sentinelle du milieu marin.....	85
IV.3 Le médaka japonais <i>Oryzias latipes</i>.....	85
IV.3.1 Biologie et écologie.....	85

IV.3.2 Cycle de vie	86
IV.3.3 Utilisation en tant qu'organisme modèle.....	87

CHAPITRE II: LES CONTAMINANTS ORGANIQUES DANS LA LAGUNE DE BIZERTE: NIVEAUX, SOURCES ET SIGNIFICATION TOXICOLOGIQUE PAR LES VALEURS GUIDES SEDIMENTAIRES

Introduction.....	89
-------------------	----

II.1 Article 1: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from the Bizerte Lagoon, Tunisia: levels, sources and toxicological significance

Abstract	
II.1.1 Introduction	91
II.1.2 Materials and methods	92
II.1.2.1 Study area	92
II.1.2.2 Sample collections, storage and preparation	93
II.1.2.3 Chemicals.....	94
II.1.2.4 Sample extraction.....	94
II.1.2.5 HPLC analysis	95
II.1.2.6 Quality assurance and quality control	95
II.1.2.7 Other analyses	96
II.1.3 Results and discussion.....	97
II.1.3.1 PAHs concentrations	97
II.1.3.2 Sediment Geochemistry and PAH Accumulation	102
II.1.3.3 PAHs composition	103
II.1.3.4 Sources of PAHs	104
II.1.3.5 Assessment of sediment quality and toxicity.....	107
II.1.4 Conclusions.....	107
Acknowledgment	

II.2 Article 2: Distribution and ecological risk of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in surface sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia

Abstract	
II.2.1 Introduction	106
II.2.2 Materials and methods	106
II.2.2.1 Sampling	106
II.2.2.2 Chemicals and materials	107
II.2.2.3 Extraction and clean-up	106

II.2.2.4 GC-ECD analysis	106
II.2.2.5 Quality control and quality assurance	106
II.2.2.6 Analysis of Sediment Characteristics.....	106
II.2.3 Results and discussion.....	106
II.2.3.1 Polychlorinated biphenyls (PCBs)	108
II.2.3.2 Organochlorine pesticides (OCPs)	114
II.2.3.2.1 DDTs	114
II.2.3.2.2 Hexachlorobenzene (HCB)	117
II.2.3.3 Principal component analysis (PCA).....	118
II.2.3.4 Ecotoxicological concerns	119
II.2.4 Conclusion	120
Acknowledgment	
Conclusion.....	135

CHAPITRE III: EVALUATION DE LA TOXICITE DES SEDIMENTS DE LA LAGUNE DE BIZERTE

Introduction.....	136
III. Article 3: Evaluation of sediment toxicity using a battery of assays. Application to sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia	137
Abstract	
III.1 Introduction	136
III.2 Materials and methods	136
III.2.1 Sampling locations	136
III.2.2 Sample collection	136
III.2.3 Physico-chemical characterisation of sediments.....	136
III.2.4 Sample preparation	137
III.2.4.1 Elutriate	139
III.2.4.2 Organic extract	139
III.2.4.3 Solide-phase sediment	139
III.2.5 Bioassay conditions.....	139
III.2.5.1 Microtox®	139
III.2.5.2 SOS-Chromotest	140
III.2.5.3 Medaka embryo-larval assay	141
III.2.6 Statistical analysis	142
III.3 Results	142
III.3.1 Sediment chemistry	142

III.3.2 Sediment extract acute toxicity	143
III.3.3 Sediment extract genotoxic potency	144
III.3.4 Whole sediment Embryo-larval toxicity assay	145
III.3.5 Multivariate analysis	159
III.4 Discussion.....	162
III.5 Conclusions.....	162
Acknowledgment	
Conclusion.....	169

CHAPITRE IV: BIOSURVEILLANCE DE LA LAGUNE DE BIZERTE PAR DEUX ESPECES SENTINELLE : MOULE (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*) ET POISSONS (*ZOSTERISSESSOR OPHIOCEPHALUS*)

Introduction.....	170
IV.1 Article 4: Assessment of pollution in the Bizerte lagoon (Tunisia) by the combined use of chemical and biochemical markers in mussels, <i>Mytilus galloprovincialis</i>.....	171
Abstract	
IV.1.1 Introduction	172
IV.1.2 Materials and methods.....	174
IV.1.2.1 Site description.....	174
IV.1.2.2 Sample collection and preparation	175
IV.1.2.3 Lipid content.....	176
IV.1.2.4 Chemicals	176
IV.1.2.5 Chemical analyses	177
IV.1.2.5.1 Extraction and clean-up.....	177
IV.1.2.5.2 Quantification of OCs and PBDEs	178
IV.1.2.5.3 Quantification of PAHs	178
IV.1.2.5.4 Quality control and quality assurance	179
IV.1.2.6 Biochemical analyses.....	180
IV.1.2.6.1 Preparation of tissue extracts	180
IV.1.2.6.2 Protein.....	180
IV.1.2.6.3 AChE.....	180
IV.1.2.6.4 CAT	180
IV.1.2.6.5 GST.....	180
IV.1.2.7 Statistical analysis	181
IV.1.3 Results.....	181

IV.1.3.1 Environmental factors	181
IV.1.3.2 Body condition of mussels.....	181
IV.1.3.3 Chemical analyses	183
IV.1.3.3.1 Organochlorinated compounds (OCs)	183
IV.1.3.3.2 Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs).....	185
IV.1.3.3.3 Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)	185
IV.1.3.4 Biochemical analyses.....	186
IV.1.3.5 Relationship between chemical and biochemical parameters.....	188
IV.1.3.6 Principal component analysis (PCA)	188
IV.1.4 Discussion	189
IV.1.4 Conclusions	197
Acknowledgment	
IV.2 Article 5: Pollution biomonitoring in the Bizerte lagoon (Tunisia), using grass goby, <i>Zosterisessor ophiocephalus</i> (Teleostei, Gobiidae) as a bioindicator species	199
Abstract	
IV.2.1 Introduction.....	200
IV.2.2 Materials and methods.....	202
IV.2.2.1 Sampling sites.....	202
IV.2.2.2 Sample collections and preparation	203
IV.2.2.3 Chemicals	204
IV.2.2.4 Chemical analyses	204
IV.2.2.4.1 Extraction and clean-up.....	204
IV.2.2.4.2 Quantification of PAHs	205
IV.2.2.4.3 Quantification of OCs	206
IV.2.2.4.4 Quality control and quality assurance	207
IV.2.2.5 Biomarkers.....	207
IV.2.2.5.1 Condition index	207
IV.2.2.5.2 Enzymatic activity.....	207
IV.2.2.5.3 AChE.....	208
IV.2.2.5.4 Lipid peroxidation	208
IV.2.2.6 Statistical analysis.....	209
IV.2.3 Results.....	209
IV.2.3.1 Spatial distribution of contaminated fish	209
IV.2.3.2 Fish biometrics.....	211
IV.2.3.3 Biomarker analysis.....	211
IV.2.3.4 Correlation analyses.....	213

IV.2.3.5 Multivariate analysis	213
IV.2.4 Discussion	216
IV.2.5 Conclusions	220
Acknowledgment	
Conclusion.....	123

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 Concentration urbaine dans la région de Bizerte (MAERH, 2003).....	12
Tableau I.2 Répartition des établissements par zone industrielle (ONAS, 2001).	12
Tableau I.3 Répartition des établissements industriels par secteur d'activité (API, 2002).	12
Tableaux I.4 Propriétés physico-chimiques des HAP.	18
Tableau I.5 HAP prédominants dans les émissions de différentes sources.	21
Tableau I.6 Facteurs d'équivalence toxique (TEF) des HAP individuels (Nisbet et LaGoy, 1992).	25
Tableau I.7 Classification des 16 HAP cancérigènes par différentes organisations (Topal, 2004).	27
Tableau I.8 Nombre d'isomères possibles de PCBs.	29
Table I.9 Principales données physico-chimiques des PCB pour chaque groupe d'isomères (données uniques sont des moyennes) (sources: Larry. W Robertson, L.G Hansen « PCBs: recent advances in environment toxicology and health aspects » - 2001 United Environment Programme: rapport sur les polluants organiques persistants).....	31
Tableau I.10 Facteur d'équivalent toxique de congénères de PCBs (Ahlborg et al., 1994).	35
Tableau I.11 Inventaire des déchets et équipements contenant des PCB en Tunisie.	36
Tableau I.12 Principales propriétés physico-chimiques des PBDE les plus rencontrés dans l'environnement (Watanabe et Tatsukawa, 1989; De Wit, 2002; Tittlemier et al., 2002; CEPA, 2006).	38
Tableau I.13 Demande commerciale de PBDE en 2001 (BSEF, 2003).	39
Tableau I.14 Propriétés physico-chimiques des pesticides organochlorés (ATSDR, 1996, 2002a,b,c; Brignon et Soleille, 2005; Fabre et al., 2005).....	42
Tableau I.15 Dose létale de quelques OCP (Bouguerra, 1985).	46
Table II.1.1 Accelerated solvent extraction (ASE) parameters	95
Table II.1.2 Optimized fluorescence conditions for PAHs determination.	96
Table II.1.3 Concentrations of PAHs (ng g ⁻¹ dw), percentage of total organic carbon (TOC) and percentage of finer grain size fractions (%<63 µm) in coastal superficial sediments of the Bizerte Lagoon.....	98
Table II.1.4 Comparison of PAH concentrations (ng g ⁻¹ dw) in sediments of other coasts, bays and lagoons in the world.....	100
Table II.1.5 The annual mean concentrations (ng g ⁻¹ dw) of individual PAHs in the sediments of the Bizerte lagoon.	101
Table II.1.6 Spearman's rank correlation coefficients (r) for sediment individual PAHs and the sum of PAHs (ΣPAHs) (n = 16).....	105

Table II.1.7 Characteristic values of selected molecular ratios for pyrogenic and petrogenic origins of PAHs.	106
Table II.1.8 Guideline values for PAH compounds in sediments (ng g ⁻¹ dw).	107
Table II.2.1 Sampling site locations and physicochemical characteristics of sediments from the Bizerte lagoon.	107
Table II.2.2 Accelerated solvent extraction (ASE) parameters.	106
Table II.2.3 Concentrations of OCP and PCB residues in surface sediments collected from Bizerte lagoon (nanograms per gram dry weight).	107
Table II.2.4 Correlation matrix of OC concentrations and sediment geochemical variables in Bizerte lagoon (n=18).	110
Table II.2.5 Comparison of OCP and PCB concentrations (nanograms per gram dry weight) in surface sediments from various locations in the world.	113
Table II.2.6 Comparison of OCP and PCB concentrations in sediments of the study area with E-RL, E-RM TEL and PEL values (nanograms per gram dry weight).	120
Table III.1 Physico-chemical composition of the fine (<2 mm) sediment fraction for the five sampling stations.	137
Table III.2 Toxicity (mg mL ⁻¹) of elutriates of sediments collected from five stations of the Bizerte lagoon and measured with the Microtox [®] assay.	144
Table III.3 Larval abnormalities following exposure of medaka embryos to superficial sediments from five stations of the Bizerte lagoon. Results are expressed in percentage of impaired larvae among overall hatched individuals. Data are mentioned as mean±SD (N=3)*.	151
Table III.4 Pearson correlation coefficients between chemical, physico-chemical variables and biological endpoints.	161
Table IV.1.1 Mussels characteristics and concentrations of organo-halogenated compounds (ng g ⁻¹ dw, mean ± SD), in their soft tissue.	182
Table IV.1.2 PAH concentrations (ng g ⁻¹ dw, mean ± SD) in the soft tissues of mussels (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) collected at five sites from the Bizerte lagoon.	186
Table IV.1.3 Pearson correlation coefficients among the different biological (CI, LC), biochemical (AChE, CAT, GST), chemical (HCB, ΣPAHs, ΣPCBs, ΣDDTs) and environmental (T°C, Sal, pH) variables tested across sites (n = 5).	188
Table IV.2.1 Averaged total length, weight, liver weight, condition factor (CF) and hepatosomatic index (HSI) of grass gobies from five sampled stations in the Bizerte lagoon.	211
Table IV.2.2 Pearson correlation coefficients for chemicals (HCB, ΣDDTs, ΣPAHs, ΣPCBs, ΣPOPs) and biological markers (EROD, AChE, GST, CAT, TBARS, CF, HSI) measured in grass goby specimens sampled at five stations in the Bizerte lagoon.	214

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 Répartition des stations de prélèvement et localisation des différentes sources de polluants.	9
Figure I.2 Carte des sédiments de la lagune de Bizerte (Soussi, 1983).....	14
Figure I.3 Schéma de la circulation des eaux et localisation des zones abritées selon Frisoni et al. (1986).	14
Figure I.4 Structures chimiques des HAP. [*Substances prioritaires selon l'agence del'environnement des États-Unis d'Amérique (US-EPA)].	17
Figure I.5 Structure générale d'un PCB.....	28
Figure I.6 Production des polychlorobiphényles par chloration catalysée du biphenyle.	28
Figure I.7 Nomenclature des différents congénères de PCB (Ballschmiter et Zell, 1980).	29
Figure I.8 Représentation des différentes toxicités des PCB (modifié Cornu, 2012).....	33
Figure I.9 Structure des PBDE.	37
Figure I.10 Spéciation des éléments traces métalliques dans les particules sédimentaires et les eaux interstitielles (k et k' représentent les constantes d'équilibre entre les formes libre et complexée d'un élément) (Charriau, 2009).	55
Figure I.11 Sources de pollution dans l'environnement (modifié Champeau, 2005).	56
Figure I.12 Schéma récapitulatif des cycles biogéochimiques des HAP dans l'environnement (McElroy et Sisson, 1989).	58
Figure I.13 Concentrations des PCB dans les milieux récepteurs et le biote (Pearson, 1982)..	59
Figure I.14 Devenir des PBDE dans l'environnement (Watanabe et Sakai, 2003).....	60
Figure I.15 Mouvement des pesticides dans la Biosphère (Ramade, 1998).	61
Figure I.16 Description schématique du cycle des éléments traces dans l'environnement. (modifié N'guessan, 2008).	62
Figure I.17 Principaux paramètres et processus intervenant dans le cycle biogéochimique des métaux (Benoit, 2005)	62
Figure I.18 Propriétés physico-chimiques des contaminants agissant sur leur bioaccumulation (Norstrom et Letcher, 1996).....	64
Figure I.19 Schéma synthétique des mécanismes de biotransformation des xénobiotiques.....	65
Figure I.20 Métabolisme simplifié du B[a]P.	66
Figure I.21 Voies d'activation métabolique du B[a]P (Marie, 2007).....	66
Figure I.22 Voies de conjugaison des métabolites du B(a)P avec l'exemple du 3- OHB[a]P et du BPDE. A: glucurono-conjugaison, B: sulfo-conjugaison, C: conjugaison au glutathion.....	69
Figure I.23 Schéma de la métabolisation des PCB (Cravedi et Narbonne, 2002).....	70

Figure I.24 Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques (modifié d'après Lagadic et al., 1997).	75
Figure I.25 Mécanisme d'action de L'acétylcholinestérase (http://lecerveau.mcgill.ca/).	77
Figure I.26 L'aire de répartition de <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Cahen, 2006).	81
Figure I.27 Anatomie interne et externe de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Khelil, 2007; CRC, 2010).	82
Figure I.28 Système respiratoire chez la moule (MPO, 2003).	83
Figure I.29 <i>Zosterisessor ophiocephalus</i> (présent travail).	85
Figure I.30 Description de cycle de vie chez <i>Oryzias latipes</i>	87
Figure II.1.1 Sampling locations in the Bizerte lagoon.	93
Figure II.1.2 Relative concentrations of PAHs by aromatic groups in sediments from the Bizerte Lagoon.	104
Figure II.1.3 Relative abundance of each grouped PAHs (%) in different time span.	104
Figure II.1.4 Plots of isomeric ratios BaA/(BaA+Chr), and Ant/ (Ant+Phe) versus Flu/(Flu+Pyr).	106
Figure II.1.5 Contributions of BaA, Chr, BbF, BkF, BaP and DahA to the total TEQ value at each station.	107
Figure II.2.1 Percentage contribution of individual polychlorinated biphenyls at each station in sediments of Bizerte lagoon.	111
Figure II.2.2 Relative distribution of p,p'-DDT and its metabolites p,p'-DDD and p,p'-DDE in sediments from Bizerte lagoon.	117
Figure II.2.3 Principal component analysis (PCA) of source contributions for POPs in the surface sediments from Bizerte lagoon.	118
Figure III.1 Map of study area with location of sampling stations.	136
Figure III.2 Schematic procedure for sediment sample preparation.	138
Figure III.3 Genotoxicity of organic extracts from sediments collected in the Bizerte lagoon. Analyses were performed using the SOS Chromotest with an S9 microsomal fraction (Quillardet and Hofnung 1985). The amount of organic extracts was 0.025 g dw equivalent sediment. The values are mean induction factors \pm S.D. for three replicates.	145
Figure III.4 Mean dissolved oxygen measured at the water-sediment interface over the 10-days of the MELAc assay for sediments collected from five stations of the Bizerte lagoon. The data shown correspond to mean percentages of three independent replicates \pm S.D. Each replicate is the mean of ten daily measurements. Stations with different letter are significantly different ($P < 0.05$).	147
Figure III.5 Embryonic (A), larval (B) and cumulative viabilities (C) of medaka embryos after exposure to the superficial sediments of the Bizerte lagoon for 20 days. The data shown correspond to mean percentages of three independent replicates \pm S.D. Stations with different letter are significantly different ($P < 0.05$).	148
Figure III.6 Hatching rate (A) and time to hatch (B) of medaka embryos exposed for 20 days to superficial sediments from five stations of the Bizerte lagoon. The data shown correspond	

to mean percentages of three independent replicates \pm S.D. Stations with different letter are significantly different ($P < 0.05$).....	149
Figure III.7 Cardiac activity measured in 10 dpf-embryos following exposure to superficial sediments from five stations of the Bizerte lagoon. Values represent the mean response (\pm SD) from three replicates. Stations with different letter are significantly different ($P < 0.05$)...	150
Figure III.8 Photographs of major abnormalities observed in Japanese medaka larvae following embryo exposure to sediments collected from five stations in the Bizerte lagoon (A) Normal larva, (B) larva showing lordosis, (C, D) individuals with skull and jaw deformities (E) individual with cranio-facial deformations, pericardial oedema and abnormal curvature of tail, (F) larva showing haemorrhage.	150
Figure III.9 Results of the PCA of the two principal components produced by chemical (Σ Metals, Σ PAHs, Σ PCBs, Σ OCPs), physico-chemical (fine particles $< 63 \mu\text{m}$, TOC, NH_4) and biological (Microtox [®] , SOS Chromotest, CV (Cumulative viabilities), HR (Hatching rate), CA (Cardiac activity), ML (Malformed larvae)) endpoints in sediments collected at five stations in the Bizerte lagoon. (A) Plot of variable vectors. (B) Plot of scores of different sites.....	160
Figure IV.1.1 The Bizerte lagoon and the five selected sampling stations.	175
Figure IV.1.2 Profile of contamination of mussels from the Bizerte lagoon by (A) PCBs and (B) different Cl-substituted PCBs and (C) DDTs.....	184
Figure IV.1.3 GST (A), AChE (B) and CAT (C) activities (mean \pm SD) in the gills of mussels <i>Mytilus galloprovincialis</i> collected from the Bizerte lagoon. Different letters indicate significant differences between stations, (Anova, $n=10$, $p < 0.05$).....	187
Figure IV.1.4 Results of the PCA of the two principal components produced by biological (CI), biochemical (AChE, CAT, GST), chemical (HCB, Σ PAHs, Σ PCBs, Σ DDTs) and environmental (T, Sal, pH) variables in mussels collected at five stations in the Bizerte lagoon. (A) Plot of variable vectors. (B) Plot of scores of different sites.....	189
Figure IV.1.5 Relationship between $(\text{DDE} + \text{DDD}) / \Sigma \text{DDT}$ and DDD / DDE in soft tissues of mussels collected from the Bizerte lagoon.	193
Figure IV.2.1 Map of the Bizerte lagoon with location of the five sampling stations.	203
Figure IV.2.2 Concentrations (Mean \pm SD) of PAHs (A), PCBs (B) and OCPs (C) in grass goby muscle from five sites of the Bizerte lagoon ($n = 3$).	210
Figure IV.2.3 Responses of AChE, EROD, GST, CAT and TBARS in <i>Zosterisessor ophiocephalus</i> collected from the Bizerte lagoon. Different letters indicate significant differences between stations, $p < 0.05$	212
Figure IV.2.4 Component loading (A) and component score (B) plots from principal component analysis: distribution of samples from the different sites based on the pattern of environmental and biochemical parameters.	215

Liste des publications et communications

Publications

Barhoumi, B., LeMenach, K., Dévier, M.-H., El megdiche, Y., Hammami, B., Ameer, W.B., Hassine, S.B., Cachot, J., Budzinski, H., Driss, M.R., 2013. Distribution and ecological risk of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in surface sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research* (sous presse).

Barhoumi, B., LeMenach, K., Dévier, M.-H., Ameer, W.B., Etcheber, H., Budzinski, H., Cachot, J., Driss, M.R., 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia: levels, sources and toxicological significance. *Environmental Monitoring and Assessment* 186, 2653–2669.

Barhoumi, B., Le Menach, K., Clérandeau, C., Ameer, W.B., Budzinski, H., Driss, M.R., Cachot, J., 2014. Assessment of pollution in the Bizerte lagoon (Tunisia) by the combined use of chemical and biochemical markers in mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin* (sous presse).

Barhoumi, B., Clérandeau, C., Le Menach, K., El Megdiche, Y., Baudrimont, M., Peluhet, L., Budzinski, H., Driss, M.R., Cachot, J., 2014. Pollution biomonitoring in the Bizerte lagoon (Tunisia), using grass goby, *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei, Gobiidae) as a bioindicator species. *Marine Environmental Research* (soumise).

Barhoumi, B., Landi, L., Clérandeau, C., Pichon, A., Lebihanic, F., Anschutz, P., Poirier, D., Driss, M.R., Cachot, J. Evaluation of sediment toxicity using a battery of assays. Application to sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia. (en préparation).

Communications par affiches

Barhoumi, B., LeMenach, K., Budzinski, H., Cachot, J., Driss, M.R. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in surface sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia. 7th PCB Workshop, *Bordeaux (France), May 2012.*

Barhoumi, B., LeMenach, K., Budzinski, H., Cachot, J., Driss, M.R. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia. 24th Congress of ATSB, *Sousse (Tunisia), March 2013.*

Barhoumi, B., Budzinski, H., Driss, M.R., Cachot, J. Assessment of pollution in the Bizerte lagoon (Tunisia) by the combined use of chemical and biochemical markers in mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Hammamet (Tunisia), March 2014.*

Liste des Abréviations et notations

ACHÉ	Acétylcholinestérase
ACN	Acetonitrile
ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
AKR	Aldo-kéto réductases
AMAP	Arctic Monitoring and Assessment Program
ANOVA	Analyse de la variance
ANPE	Agence National du Protection de l'Environnement
API	Agence de Promotion Industriel
ASE	“ Accelerated Solvent Extraction ” (Extraction par Solvant Accélérée)
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BaPeq dose	Benzo(a)Pyrene-equivalent doses
BPDE	Benzo[a]pyrène-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde
BSA	Bovine Serum Albumin
BSEF	Bromine Science and Environmental Forum
BSR	Bactéries Sulfato-Réductrices
CAT	Catalase
CCME	Canadian Council of Ministers of the Environment
CDNB	1-chloro, 2,4,dinitrobenzene
CEPA	Canadian Environmental Protection Act
CF	Facteur de Condition
CI	Indice de Condition
CIEM	Conseil international pour l'Exploration de la Mer
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CL50	Concentration Létale 50
TOC	Carbone Organique Total
CRC	Comité Régional de la Conchyliculture

CRDA	Commissariat Régional au Développement Agricole
DCM	Dichloromethane
DDD	Dichlorodiphényldichloroéthane
DDE	Dichlorodiphényldichloroéthylène
dpf	days post fertilisation
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DGPA	Direction Générale de la Pêche et de l'Aquaculture
DGPCQPA	Direction Générale de la Protection et du Contrôle de la Qualité des Produits Agricoles
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRDA	Direction Régionale du Développement Agricole
DRE	Direction des Ressources en Eau
DTNB	Dithiobis-nitrobenzoate
dw	dry weight
EPA	Environmental Protection Agency
ERL	“ Effect range low ” (niveau d'effets peu probables)
ERM	“ Effect range medium ” (niveau d'effets probables)
EROD	Ethoxyrésorufine O-dééthylase
ETM	Eléments Traces Métalliques
FBA	Facteur de bioamplification
FBC	Facteur de bioconcentration
FP	Détecteur Fluorescence
GC/ECD	Chromatographie en phase gazeuse/détecteur à capture d'électron (“gas chromatography-electron capture detector”)
GC/MS	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (“gas chromatography-mass spectrometry”)
GST	Glutathion-S-transférase
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCB	Hexachlorobenzène
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance (“High-pressure liquid chromatography ”)
HMW	High Molecular Weight (haut poids moléculaire)

HSI	Indice hépatho-somatique
H₂O₂	Hydrogen peroxide
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICES	International Council for the Exploration of the Sea
IF	Facteur d'Induction
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité
INSTM	Institut National des Sciences et Technologies de la Mer
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K_{ea}	Coefficient de partage eau/air
K_{oc}	Coefficient de partage carbone organique/eau
K_{ow}	Coefficient de partage n-octanol/eau
K_p	Coefficient de partage carbone sédiment/eau
LC	Lipid Content
LMW	Low Molecular Weight (faible poids moléculaire)
LOD	Limit of Detection
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
LOQ	Limit of Quantification
LPTC	Laboratoire de Physico- et Toxico-Chimie des systèmes naturels
MAERH	Ministère de l'Agriculture de l'Environnement et des Ressources Hydrauliques
MAE	Microwave Assisted Extraction
MEDD	Ministère de l'Environnement et du Développement Durable
MELA	Medaka embryo-larval assay
MELA	Test embryo-larvaire Medaka
ml	Millilitre
MPO	Ministère des pêches et des Océans
Nd	not detected
ng	Nanogramme.

NH⁴⁺	Ions ammonium
NIST	National Institute of Standards and Technology
NOEC	No Observed Effect Concentration
OC	Organochlorés
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OCN	Octachloronaphtalène
OCP	Pesticides Organochlorés
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONAS	Office National de l'Assainissement
PBDE	Polybromodiphényléthers
PCA	Principal component analysis
PCB	Polychlorinated biphenyls
PCDD	polychlorodibenzo-dioxines
PCDF	polychlorodibenzo-furanes
Pe	point d'ébullition
PEL	“ Probable effect level ” (seuil d'effets probables)
pf	poids frais
Pf	point de fusion
PNUE	Programme des Nations Unies pour l'Environnement
POP	polluants organiques persistants
ps	poids sec
PTFE	Polytetrafluoroéthylène
Pvs	Pression de vapeur saturante
ROS	Reactive oxygen species
RTECS	Registry of Toxic Effects of Chemical Substances
S	Solubilité
SIM	Selective Ion Monitoring
SPD	Premiers stades de développement
SQG	“ Sediment quality guideline ” (valeur guide de qualité des sédiments)
SRM	Matériel de référence standard (“ <i>standard reference material</i> ”)

T°	Température
TBARS	Acide thiobarbiturique
TEF	Facteur d'Equivalent Toxique
TEL	“ Threshold effect level ” (seuil d'effets potentiels)
TEQ	Toxic Equivalent Quantity
TIE	Toxicity Identification Evalutaion
UE	Union Européenne
UNECE	United Nations Economic Commission for Europe
UNEP	United Nations Environment Program
US EPA	United States Environment Protection Agency
WHO	World Health Oganisation
< 63 µm	proportion de particules sédimentaires dont la taille est inférieure à 63 µm



INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis quelques années une dégradation de plus en plus importante de la qualité de nos écosystèmes aquatiques a été constatée (Bennasser et al., 1997; Jadal et al., 2002). Celle-ci semble être engendrée d'une façon ou d'une autre par le développement des sociétés humaines. Les rejets agricoles, urbains et industriels peuvent conduire à de hauts niveaux de pollution dans les écosystèmes marins côtiers (Smolders et al., 2003; Rao et al., 2007; D'Adamo et al., 2008). Les rejets d'origine urbaine, agricole et industrielle altèrent les communautés et affectent les organismes qui les composent (Boening, 1999; Warwick, 2005). Une baisse de la production halieutique de ces milieux a été enregistrée dans différentes régions et notamment dans les lagunes qui constituent des écosystèmes exigus et relativement confinés. Ceci est le cas de la lagune de Bizerte (ANPE, 1990), située à l'extrême nord de la Tunisie.

Dans le milieu aquatique, une grande partie des composés d'origine anthropique ou naturelle tendent à s'accumuler dans les sédiments et, souvent, à se concentrer dans les réseaux trophiques aquatiques. Ils sont introduits dans les cours d'eau sous formes particulaire, dissoute et colloïdale par les activités industrielles, urbaines et agricoles, ainsi que par transport atmosphérique. Les métaux, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les polychlorobiphényles (PCBs), et les pesticides organochlorés (OCPs), qui ne se retrouvent qu'en concentrations traces dans l'eau, constituent des exemples de substances toxiques et hydrophobes, qui ont tendance à s'accumuler dans la phase sédimentaire. Malgré l'interdiction de l'emploi de certains de ces polluants en Amérique du Nord et en Europe depuis plus de 40 ans et en Tunisie depuis les années 80, ils continuent à poser des problèmes du fait de leur persistance dans l'environnement. Les sédiments peuvent donc représenter une source importante de contaminants pour les communautés d'organismes qui y résident ou qui les fréquentent (Larsson, 1985; Salomons et al., 1987; Loring et Rantala, 1992), lesquels peuvent alors constituer un risque pour la santé humaine (e.g., consommation de mollusques ou de poissons de fond contaminés). Les autorités américaines estiment que 10 % des sédiments présents dans leur lacs, rivières et baies sont suffisamment contaminés par des composés toxiques pour avoir des effets néfastes sur les organismes aquatiques, mais également sur la population humaine consommatrice des ressources aquatiques présentes dans ces milieux (Long, 2000; McCauley et al., 2000). Il paraît donc nécessaire de prendre en compte le risque environnemental associé à la contamination des sédiments en caractérisant la nature et la quantité de polluants stockés dans ce compartiment ainsi que la toxicité globale qu'ils représentent. Pour ces raisons, un grand nombre d'intervenants du milieu marin (scientifiques, gestionnaires, agences gouvernementales, et le public en général) s'intéressent

au développement de nouvelles approches et outils pour mesurer les effets de la pollution urbaine, industrielle et agricole sur les écosystèmes marins (Burger et al., 2006). Des mesures d'ordre réglementaire (interdiction ou limitation de l'usage de certains composés chimiques) sont également appliqués, afin, de protéger l'homme et son environnement. Le gouvernement Tunisien a réagi contre la dégradation des milieux aquatiques en signant notamment le protocole de la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants. Ce protocole interdit l'utilisation des PCB, de l'aldrine, le chlordane, la dieldrine, l'endrin, l'heptachlore, l'hexachlorobenzène (HCB), le mirex et le toxaphène (APEK, 2005).

A l'heure actuelle, en comparaison des écosystèmes continentaux, les études consacrées au milieu marin sont moins abondantes, en Tunisie en particulier.

En raison de limitations techniques et financières, l'analyse chimique des micropolluants organiques et métalliques présents dans les différents compartiments aquatiques n'est pas toujours possible du fait de la multiplicité des molécules présentes, et ceci souvent à des concentrations inférieures aux limites de détection analytique (Narbonne, 1998). Par ailleurs, une telle approche ne renseigne pas sur les risques encourus par les populations animales ou végétales exposées aux polluants (Léveque, 1997), et ne peut prédire les effets biologiques des mélanges de contaminants (synergies...) ni quantifier simplement la biodisponibilité des polluants pour les organismes vivants (Dutka, 1998). Les analyses chimiques permettent la détection, la caractérisation et la quantification de la plupart des contaminants présents dans les différents compartiments aquatiques, mais donnent peu d'informations sur l'état de santé des populations exposées. Il existe donc un besoin urgent d'utiliser plus largement les bioessais (tests biologiques), qui peuvent être utilisés dans la biosurveillance de la pollution marine, en complément des techniques de chimie analytique. Ces tests peuvent fournir des résultats plus rapides, plus fiables et plus intégrateurs et représentent un outil efficace pour la protection de l'environnement. Comme ils peuvent être mis en œuvre avec un équipement et un investissement relativement modestes et fournissent des résultats plus faciles à interpréter, ils sont probablement destinés à un essor important dans les pays développés et en développement (OCDE, 1987).

Les espèces benthiques sont exposées directement aux contaminants adsorbés sur la phase particulaire, mais aussi à ceux qui sont dissous dans la couche d'eau interstitielle et dans l'eau à l'interface eau-sédiment. De nombreux bioessais, plus ou moins standardisés, permettent d'évaluer les effets des sédiments marins contaminés vis à vis des organismes benthiques. Ils utilisent principalement des amphipodes, des polychètes, des copépodes, des larves d'insecte chironome et des bivalves (Swartz et al., 1979, 1982, 1985, 1988, 1989; ASTM, 1992;

Chapman et Morgan, 1983; Carr et al., 1989; Becker et al., 1990; Eertman et al., 1993; Burgess et Morrison, 1994; Long et Wilson, 1997; Matthiessen et al., 1998). Toutefois, ces tests sont relativement longs (entre 10 et 28 jours), utilisant souvent la survie comme réponse biologique, ils sont donc peu sensibles. De plus, certaines espèces utilisées sont sensibles aux caractéristiques physiques des sédiments telles que la granulométrie et la teneur en matière organique (DeWitt et al., 1988; Lacey et al., 1999; Cripe et al., 2000) et il est alors difficile de discerner les véritables effets dus aux contaminants. Des tests plus rapides, Microtox[®] (Chapman, 1992; Carr et al., 1996a; Qureshi et al., 1998), SOS-Chromotest[®], Mutatox[®], spermio et embryotoxicité chez les bivalves et échinodermes (Ames et al., 1975; Quillardet et al., 1982, 1985; Chapman et Morgan, 1983; Meador et al., 1990; Chapman et al., 1991; Carr et al., 1996b; Carr, 1998; Thompson et al., 1999; Miller et al., 2000) ont aussi été développés, mais à l'heure actuelle, ils sont généralement utilisés sur des extraits organiques ou aqueux de sédiment (eau interstitielle, éluutriats) et non sur le sédiment lui-même. De plus, les bioessais pratiqués en laboratoire ne peuvent refléter les variations spatiotemporelles de la température, la salinité, le pH, la lumière et l'oxygène du milieu naturel, pouvant modifier la spéciation et donc la toxicité des contaminants. Ils permettent seulement d'évaluer « une toxicité potentielle » de ces sédiments sans que l'on connaisse vraiment sa signification sur le plan écologique.

Pour ce qui concerne les organismes pélagiques, ils peuvent être contaminés par le relargage de contaminants sédimentaires dans la colonne d'eau et par la voie trophique (de nombreuses espèces se nourrissent d'organismes benthiques). Ainsi le passage de xénobiotiques du sédiment vers la colonne d'eau se fait par diffusion, mais surtout lors de la remise en suspension des sédiments, par des phénomènes naturels (marée, tempêtes, bioturbation; Chapman et al., 1998) et par l'activité humaine comme les opérations de dragage (Lee et Jones, 1982; Fichet et al., 1998; Matthiessen et al., 1998). Cet impact des sédiments contaminés sur les organismes pélagiques a été à ce jour, moins abordé que celui sur les organismes benthiques (Burgess et Scott, 1992; Burgess et al., 1993). Pourtant, ces deux types d'organismes (benthiques et pélagiques) doivent être pris en compte au même titre si on veut réellement protéger l'environnement marin.

Les larves et embryons sont des stades particulièrement sensibles aux variations des conditions environnementales (Sundberg et al., 2005). Cependant, ces stades ont une importance écologique majeure à la fois pour le renouvellement des populations mais également en raison de leur rôle clé dans les réseaux trophiques. Afin de préserver les écosystèmes aquatiques, il paraît primordial d'étudier la sensibilité de ces stades de

développement vis-à-vis de la pollution chimique. Récemment l'équipe EPOC (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux) de l'Université de Bordeaux a développé et validé un bioessai permettant l'analyse de la toxicité des composés hydrophobes fixés sur une matrice sédimentaire. Ce test, baptisé MELAc (embryo-larvaire Medaka en sédiment-contact), consiste à exposer des embryons de medaka japonais en contact direct avec un sédiment naturel ou enrobé pendant toute la durée du développement embryonnaire puis d'étudier les effets produits sur les embryons et les larves à l'éclosion (Vicquelin et al., 2011; Barjhoux et al., 2012). Ce test peut pallier les difficultés des bioessais décrits précédemment, car il prend en compte les contaminants dissous et ceux liés aux particules sédimentaires.

Le but final des essais biologiques est d'évaluer l'impact des micro-polluants, sédimentaires en particulier, de la façon la plus réaliste possible sur le plan environnemental. Or le prélèvement, le stockage et la manipulation des sédiments peuvent modifier la biodisponibilité des contaminants et par conséquent leur toxicité. Ceci représente la principale limite des tests biologiques en laboratoire (Lamberson et al., 1992; Burton, 1992), d'où l'intérêt des mesures in situ notamment de biomarqueurs.

Les bioessais reflètent la toxicité de la fraction biodisponible des contaminants, mais ne permettent pas d'identifier les composés responsables des effets biologiques observés. Cette biodisponibilité des contaminants dépend de nombreux facteurs physiques (granulométrie et teneur en matière organique du sédiment et des particules en suspension...), chimiques (solubilité et réactivité des composés, présence d'agents complexants...), biologiques (organismes pélagiques ou benthiques utilisés, mode de contamination...) (Borgmann, 2000). Elle peut dans une certaine mesure être mesurée par l'accumulation des contaminants par les organismes indicateurs. C'est dans cette optique que Goldberg (1975) a proposé de suivre à l'échelle internationale, les concentrations des contaminants dans les organismes vivants pour surveiller le milieu. En effet, les teneurs dans les organismes sont de meilleurs indicateurs de la qualité du milieu que la mesure des concentrations en polluants dans le milieu même. Les organismes marins concentrent les contaminants, en particulier les métaux divalents, en relation avec les concentrations présentes dans l'écosystème (Goldberg, 1975). C'est le principe des « bio indicateurs quantitatifs ».

La valeur de la concentration, mesurée dans l'organisme indicateur, est la résultante de processus impliqués à différentes échelles: à l'échelle du contaminant (nature du contaminant, spéciation chimique, biodisponibilité etc...), à l'échelle de l'organisme récepteur (propriétés membranaires, voies d'entrée, voies de sortie, cycle de vie etc...) mais aussi à l'échelle de

l'environnement intra et extra cellulaire (température, conditions trophiques, contamination du milieu etc...). L'étude de la contamination se heurte en permanence à cette complexité due à la diversité des facteurs abiotiques et biotiques mais surtout à leurs variations et interactions dans l'espace et le temps. Pour constituer un bon « bioindicateur quantitatif », l'espèce animale utilisée doit avoir, selon Butler et al. (1971) et Philips et Rainbow (1994), les qualités suivantes: l'organisme doit concentrer le contaminant, sans effet létal, aux concentrations rencontrées dans le milieu; il doit être sédentaire afin d'être représentatif de la zone d'échantillonnage; il doit être abondant dans la zone étudiée; il doit avoir une durée de vie suffisamment longue pour permettre l'échantillonnage de plusieurs classes d'âges; il doit être euryhalin et facile à prélever. Dans le présent travail les espèces que nous avons utilisé comme modèle biologique (*Mytilus galloprovincialis* et *Zosterisessor ophiocephalus*) répondent à tous les caractères décrits précédemment. Ainsi, le suivi de la contamination côtière par les métaux et les contaminants organiques, au moyen de ces deux espèces sentinelles, est de pratique courante dans de nombreux programmes de surveillance à travers le monde (Cossa, 1985; Goldberg, 1986; Livingstone et al., 1995; Lopez-Barea et Pueyo, 1998; Franco et al., 2002b; Louis, 2010; Hajji et al., 2013).

D'autres outils, les biomarqueurs, sont utilisables pour étudier la biodisponibilité des contaminants. La notion de biomarqueur a été définie par Lagadic et al. (1997) comme étant « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ». L'utilisation de biomarqueurs a pour but de mettre en évidence de façon précoce une pollution ou de qualifier l'état de santé d'un organisme exposé. Les biomarqueurs proposés se situent à différents niveaux des mécanismes d'action toxique, allant de la cause aux effets. Les paramètres peuvent se mesurer de la première interaction de l'agent toxique avec un récepteur cellulaire jusqu'aux altérations structurelles et fonctionnelles. Ainsi sont apparues les notions de:

Biomarqueurs d'exposition qui sont généralement caractérisés par leurs réponses précoces et leur spécificité vis-à-vis d'une classe de polluants. Ils sont en général impliqués dans la (dé)toxification des xénobiotiques (ex.: cytochromes P450) ou dans les mécanismes de défense cellulaires (ex.: enzymes antioxydantes). Ils sont induits par un type spécifique de polluants (ex.: induction chez le poisson du cytochrome P450 CYP1A par les HAPs, PCBs et dioxines) et, de ce fait, leurs variations de niveau cellulaire sont indicatrices d'une exposition de l'organisme à cette classe de polluants. Ils n'entraînent pas obligatoirement d'effets délétères.

Biomarqueurs d'effet qui correspondent à une altération biologique qui, en fonction de l'intensité de la réponse, peuvent être associées à une altération possible de l'état physiologique de l'individu, comme des effets sur la croissance ou sur le succès reproducteur. Ils révèlent l'action des contaminants par la mesure de paramètres biologiques. Ces derniers sont très nombreux et variés suivant le niveau biologique considéré (biochimique, cellulaire, physiologique...). Contrairement aux biomarqueurs d'exposition, ces biomarqueurs ne sont pas spécifiques d'une classe de polluants, sont très intégrateurs.

Les biomarqueurs de sensibilité/susceptibilité correspondent à des molécules biologiques comme les protéines qui, lorsqu'elles sont sur-exprimées ou sous-exprimées, augmentent la sensibilité d'un organisme à un contaminant.

Ces outils peuvent être intégrés au sein de la stratégie de surveillance des milieux en complément avec les autres outils (analyses chimiques et Bioessais). En combinant des données chimiques (concentrations en contaminants) et toxicologiques (tests de toxicité et informations sur la communauté benthique), des valeurs guides sédimentaires (SQG, sediment quality guideline) ont ainsi été obtenues. Ces derniers sont de plus en plus utilisés en tant que valeurs de référence et d'aide à l'interprétation des données sédimentaires (tendances historiques, identification des composés les plus problématiques). Elles peuvent également faciliter le classement des cours d'eau contaminés en fonction de la toxicité potentielle des sédiments et permettent l'identification des composés les plus problématiques et les sites d'intérêt pour leur étude ou leur restauration (Geffard, 2001; Wenning, 2005).

C'est dans ce contexte que nous avons élaboré ce travail de recherche. Ce travail s'inscrit dans la continuité de plusieurs études qui ont été réalisées ces vingt dernières années dans la lagune de Bizerte. En effet, plusieurs travaux de recherche se sont intéressés à l'étude de la distribution des métaux, des OCs, des HAPs et des PCBs dans les sédiments de cette lagune (Cheikh et al., 2002; Mzoughi et al., 2002; Derouiche et al., 2004; Trabelsi et Driss, 2005; Ben Said et al., 2008; Louiz et al., 2008; Ben Garali et al., 2010; El Ati Hellal et al., 2011). Mais, à ce jour aucun travail ne s'est intéressé à l'évaluation de la qualité des sédiments. Il existe également peu de données sur le niveau de contamination des organismes aquatiques de cette lagune par les OCs, les PCBs et les PBDE (Ben Ameer et al., 2011; Ben Ameer et al., 2013a,b). Cependant il n'y a aucune étude s'est intéressée à la contamination du biote par les HAPs.

Les travaux réalisés par Ben Ameer et al. (2013b) ont été effectués sur des organismes prédateurs situés au sommet de la chaîne trophique qui sont généralement caractérisés par une forte bioaccumulation des POPs (à travers la colonne d'eau). Ainsi, la biosurveillance de la

lagune de Bizerte par des organismes sédentaires (bivalves et poissons) situés en bas de la chaîne trophique paraît nécessaire afin d'obtenir une idée sur la contamination générale de la lagune pour les différents niveaux de la chaîne trophique marine.

La lagune de Bizerte a fait aussi l'objet de plusieurs travaux dans le but d'évaluer les réponses des biomarqueurs notamment chez les mollusques (Dellali et al., 2001a,b, 2004; Roméo et al., 2006; Mahmoud et al., 2010), mais il n'y a pas eu véritablement d'études sur les réponses biologiques des poissons. Ces travaux ont montré que les connaissances acquises sur la lagune de Bizerte sont fragmentaires et se limitent généralement au dosage des polluants ou à l'étude de biomarqueurs.

L'objectif de cette étude est d'établir un bilan de la qualité du milieu lagunaire en utilisant une approche multi-marqueurs. La réalisation de cet objectif passe par:

- 1) l'évaluation du niveau de contamination des sédiments superficiels de la lagune de Bizerte par les polluants organiques persistants;
- 2) l'évaluation de la toxicité potentielle des sédiments, à l'aide d'une batterie de bioessais;
- 3) l'évaluation du taux d'imprégnation tissulaire des espèces ciblées de la lagune de Bizerte par des polluants organiques persistants (POPs) d'origine agricole (OCPs), industrielle (PCB, polybromodiphényl éthers (PBDE)) et naturelles/industrielle (HAP);
- 4) l'évaluation de l'état de santé et des réponses de quelques biomarqueurs d'exposition et d'effet en relation avec les niveaux en POPs chez la moule et le gobie: indices physiologiques (indice de condition, facteur de condition et indice hépato-somatique) et perturbations biochimiques. Nous avons privilégié une approche multibiomarqueurs (biomarqueurs d'exposition et biomarqueurs d'effets) en sélectionnant les paramètres biochimiques suivants:
 - une enzyme impliquée dans les mécanismes de défense antioxydante: la catalase (CAT);
 - Un indicateur de stress oxydant: l'acide thiobarbiturique (TBARS);
 - Une activité enzymatique de détoxification de phase I: Ethoxyrésorufine O-dééthylase (EROD);
 - Une activité enzymatique de détoxification de phase II: glutathion-S-transférase (GST);
 - Une enzyme impliquée dans le recyclage de l'acétyl-choline au niveau des terminaisons nerveuses cholinergiques: l'acétylcholinestérase (AChE).

Ce mémoire de thèse est organisé en 4 chapitres principaux:

Le premier chapitre, représente une synthèse bibliographique qui est divisée en quatre parties: La première est une présentation générale du site d'étude (la lagune de Bizerte) avec une description des activités anthropiques autour de la lagune puis un bref aperçu sur la sédimentologie et la courantologie de cette lagune. La deuxième présente l'état des connaissances actuelles sur les cinq familles de contaminants organiques et métalliques étudiés: Les HAPs, les PCBs, les PBDE, les OCPs et les métaux. Les différents aspects abordés directement ou indirectement au cours de ces travaux, sont traités: Structures, propriétés physico-chimiques, sources d'introduction dans l'environnement, présence et devenir dans les différents compartiments environnementaux surtout aquatiques, métabolisme et toxicité. Cette partie décrit également les réglementations européennes et internationales qui contrôlent la présence des contaminants étudiés dans l'environnement aquatique. La troisième partie décrit les différents indicateurs chimiques, écologiques et toxicologiques étudiés pour l'évaluation de la qualité des sédiments. La quatrième partie est un ensemble de généralités sur la biologie et l'écologie des modèles biologiques étudiées.

Le second chapitre se focalise sur la contamination des sédiments superficiels par les HAPs, PCBs et OCPs. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'analyse, la distribution, et l'évaluation des sources possibles de ces composés. Par la suite les résultats ont été comparés avec ceux de la littérature. Ce chapitre se termine par une évaluation de la toxicité potentielle des sédiments grâce à l'utilisation de différentes valeurs guides sédimentaires.

Le troisième chapitre s'intéresse à l'évaluation de la toxicité des sédiments à l'aide d'une batterie de bioessais sur bactéries (Microtox[®] et SOS-Chromotest[®]) et sur embryons de poissons (tetst MELAc).

Après une première publication sur l'évaluation du niveau de contamination des moules de la lagune (*Mytilus galloprovincialis*) par les POPs étudiés en relation avec la réponse des biomarqueurs biochimiques sélectionnés (GST, AChE et CAT) et certain facteurs biotiques (indice de condition) et abiotiques (température, salinité et pH), **le chapitre 4** présente dans une seconde publication l'état de santé d'un autre maillon de la chaîne trophique, le poisson gobie *Zosterisessor ophiocephalus*. L'évaluation de l'état de santé de ce poisson inclut la mesure de la concentration des POPs et l'utilisation d'une approche multibiomarqueurs (EROD, GST, AChE, CAT et TBARs) et certain facteurs biotiques (facteur de condition et indice hépato-somatique)

A la fin, l'ensemble des résultats présentés est discuté dans une conclusion générale, dans laquelle sont exposées les perspectives ouvertes par cette étude.



CHAPITRE I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Présentation du site d'étude: la lagune de Bizerte

I.1 Présentation générale

La lagune de Bizerte, désignée par les romains sous le nom « *Lacus Hipponensis* » ou lac d'*Hippones* par référence à l'ancienne appellation de la ville de Bizerte « *Hippone Akra* », correspond à une dépression antépliocène remaniée pendant le villafranchien (Mansouri, 1996). Elle est localisée à l'extrême Nord-Est tunisien, entre 37°80'-37°14' de latitude Nord et 9°46'-9°56 de longitude Est (Figure I.1). Elle s'étend sur une superficie de 128 km² (la largeur maximale est de 11 km et la longueur maximale est de 13 km) avec une profondeur moyenne de 7 m. Elle communique avec la mer par un goulet de 7 km de longueur et 12 m de profondeur. La lagune draine un bassin versant de l'ordre de 380 km². Elle est reliée dans sa partie ouest à un second plan d'eau, le lac Ichkeul, par l'intermédiaire du canal Tinja d'environ 5 km de long et de quelques mètres de profondeur (3 mètres en période de crue). Elle reçoit plusieurs cours d'eau qui sont les oueds El Merdj et Abbés au Nord, les oueds Merazig et Halima au Nord-Ouest, les oueds Soula et Tinja à l'Ouest, les oueds Guenniche, El Hella, Djedara et El Khima, à l'Est et les oueds Guennine, Ben Hassine, Douamis, El Gouraya, Garek, Tliba et Chegui au Sud.

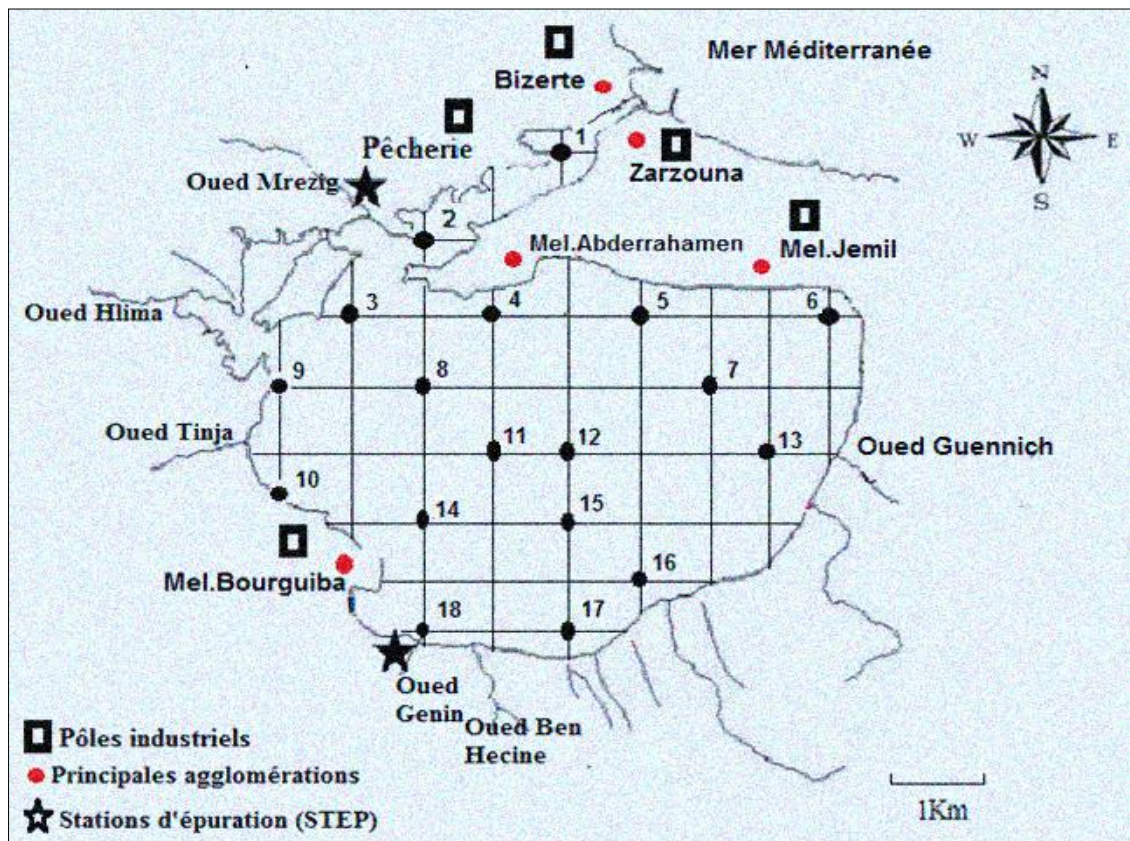


Figure I.1 Répartition des stations de prélèvement et localisation des différentes sources de polluants.

I.2 Cadre climatique

Le climat de la région de Bizerte est de type méditerranéen à nuance sub-humide où l'été est chaud et sec et l'hiver est doux et pluvieux (Kallel, 1989). Les vents soufflent généralement du secteur nord-ouest. Les vents d'ouest sont les plus fréquents et soufflent à des vitesses comprises entre 5 et 9 m•s⁻¹ pouvant atteindre 15 m•s⁻¹ (HIDROTECNICA PORTUGUESA, 1995). La température de l'air dans la région de Bizerte varie entre 10 °C au mois de janvier et 27 °C au mois d'août avec une moyenne annuelle de 19 °C. Les précipitations moyennes annuelles sont de l'ordre de 74 mm³•an⁻¹ (ANPE, 1990). Environ 65 % des pluies sont enregistrées pendant la saison hivernale (ANPE, 1990). De fortes évaporations sont généralement enregistrées aux mois de juillet et août alors que de faibles niveaux d'évaporations sont enregistrés aux mois de janvier et décembre. Le bilan précipitation-évaporation est estimé à -83 mm³•an⁻¹ en moyenne (ANPE, 1990).

I.3 Activités anthropiques autour de la lagune de Bizerte

I.3.1 Exploitation des ressources naturelles

La lagune de Bizerte a eu depuis toujours une vocation aquacole, en raison de sa position géographique. Les activités conchylicoles ont commencé vers les années 1950 par l'ostréiculture (*Crassostrea angulata*). L'Office National des Pêches (ONP) a tenté en 1958 d'élever l'huître *Ostrea edulis* puis en 1972 l'huître *Crassostrea gigas*. Les cultures de la moule (*Mytilus galloprovincialis*), espèce autochtone du canal de Bizerte, ont débuté en 1963. Parallèlement, des grossissements ont porté sur les clovisses (*Ruditapes decussatus*).

Selon un rapport de l'ANPE (1990), la production de bivalves dans la lagune de Bizerte a diminué d'environ moitié entre 1979 (375,50 tonnes) et 1989 (146,20 tonnes). En 1998, cette production s'est élevée à 117,90 tonnes réparties en 115,40 tonnes de moules, 2,30 tonnes de palourdes et 0,003 tonnes d'huîtres (DGPA, 1999). En 2002, la production conchylicole a encore été plus faible avec un total de 90,966 tonnes (84,156 tonnes de moules et 6,810 tonnes d'huîtres) (DRDA, 2003). Enfin, une nette amélioration quantitative a été notée en 2007 avec une production de 223,302 tonnes de bivalves (215, 887 tonnes de moules et 7,415 tonnes d'huîtres) (DRDA, 2008).

La lagune de Bizerte a eu depuis toujours une vocation halieutique du fait de sa position géographique et de ses ressources potentielles. La pêche s'y pratiquait aisément à la fin du 19^{ème} et au début du 20^{ème} siècle. De 1895 à 1905, le secteur d'étude comptait parmi les plus poissonneux du monde; les pêches saisonnières permettaient d'y récolter jusqu'à 22 000

daurades par jour avec de gros spécimens de 5 kg (Salvator, 1900). Selon De Fages et Parzevera (1903), quelques bordigues en clayonnages grossiers permettaient la capture de très importantes masses de poissons (262 308 kg en 1893; 338 739 kg en 1895 et 528 893 kg en 1897).

Actuellement, la lagune de Bizerte fait face à une très nette diminution de la production halieutique. En effet, seuls 100 tonnes/an de poissons ont été pêchés de 1981 à 1997 (DGPA, 1999). Une production totale de 128 108 kg, constituée essentiellement de marbrés, de spars, de bigerons, de daurades et de chiens de mer, a été enregistrée en 1998 (DGPA, 1999). En 2002, la production halieutique s'est montée à un total de 142 995 kg et a été caractérisée par une prédominance des allaches, des saurels, des merlans et des mendoles (DRDA, 2003). Enfin, l'année 2007 a vu une légère augmentation de la masse de poissons pêchés avec un total de 168 119 kg composés principalement de saurels, d'allaches, de sardines et de mendoles (DRDA, 2008).

I.3.2 Urbanisation et développement des activités industrielles et agricoles

La lagune de Bizerte est délimitée par les villes de Bizerte, de Zarzouna, de Menzel Jemil et Menzel Abderrahmen du côté Nord, de Menzel Bourguiba et de Tinja du côté Ouest et Sud Ouest. Les zones urbaines dans la zone d'étude connaissent une concentration démographique très élevée (Tableau I.1) et des activités industrielles multiples (Tableau I.2 et I.3). Depuis les années 1950, environ 400 unités industrielles se rapportant à divers domaines d'activité comme la pétrochimie, le textile, la sidérurgie et la transformation de plastiques ont été créées sur les rives de la lagune de Bizerte. Les plus importants sont l'usine « Ciments de Bizerte » créée en 1952, l'usine métallurgique « El Fouledh » de Menzel Bourguiba en 1965 (ANPE, 1990) et l'usine « Tunis Acier » (Bizerte) créée en 1991. Sur les plaines d'El Azib, de Khetmine et d'El Alia du côté Est et d'Oum Hani, d'El Mouasset et de Jouaouda du côté Sud se développe une activité agricole diversifiée. La superficie agricole totale autour de la lagune de Bizerte est de 12.700 hectares répartis comme suit: Grandes cultures (7 800 ha); Arboriculture (500 ha); Cultures maraîchères (3.400 ha); Forêts (300 ha) (MAERH, 2003).

La dépression de la lagune de Bizerte est soumise à un ensemble de nuisances occasionnées par:

- ✓ Des rejets hydriques provenant des zones urbaines;
- ✓ Des rejets industriels divers provenant des zones industrielles dans la zone;
- ✓ Des rejets de déchets solides divers provenant des zones urbaines et des activités industrielles;

- ✓ Des rejets provenant des activités agricoles sur le bassin versant.

Tableau I.1 Concentration urbaine dans la région de Bizerte (MAERH, 2003).

	Population	
	1994	2000
Délégations		
Bizerte Chamalia	67.716	72.680
Bizerte Janoubia	40.634	43.612
Menzel Jemil	33.090	35.515
Menzel Bourguiba	54.352	58.336
El Alia	21.366	22.932
Zarzouna	19.121	20.522
Tinja	18.082	19.407
Total	254 331	273,004

Tableau I.2 Répartition des établissements par zone industrielle (ONAS, 2001).

Zone industrielle	Nombre d'établissements	Taux (%)
Bizerte	41	23,70
Menzel Bourguiba	19	10,98
El Alia	15	8,67
Menzel Abderrahmen	4	2,31
Menzel Jmil	30	17,34
Zarzouna	21	12,14
Ras Jbel	19	10,98
Mateur	24	13,87
Total	173	100,00

Tableau I.3 Répartition des établissements industriels par secteur d'activité (API, 2002).

Activités industrielles	Nombre d'établissements	Taux (%)
Cuir et chaussures	34	11
Industrie électrique, électronique et électroménagène	29	9
Imprimerie	2	1
Industrie chimique, plastique, verre et pneumatique	17	5
Industrie mécanique et entretien des bateaux	17	5
Matériaux de construction	18	6
Menuiserie et industrie de bois	8	2
Papeterie	2	1
Sidérurgie et traitement de surface	26	8
Textiles et confection	120	37
Industrie agro-alimentaire	24	7
Autres	15	5
Total	322	100

I.4 Sédimentologie et courantologie de la lagune de Bizerte

Selon les travaux de Soussi (1981), Soussi et al. (1983) et Ouakad (1993), la lagune de Bizerte présente un gradient décroissant centripète de la granulométrie avec concentration des particules fines au centre. Trois principaux faciès (sableux, argileux et silteux à argilo-silteux) ont pu être distingués en fonction de la morphologie du fond et de la diversité des apports (Figure I.2):

- Secteurs Nord-Est et Nord-Ouest: les sédiments y sont principalement grossiers et composés par des débris coquilliers et des sables fins;
- Secteur Est: les sédiments y sont essentiellement sableux jusqu'à l'isobathe -5 m. Au-delà de cette profondeur et jusqu'à l'isobathe -9 m, le faciès silteux à argilosilteux devient prédominant dans les sédiments superficiels;
- Secteurs occidental et central: la zone centrale de la lagune ainsi que toute la zone située au large de l'embouchure de l'oued Tinja est caractérisée par le faciès argileux;
- Secteur Sud: les dépôts sableux occupent toute la bande littorale.

Frisoni et al. (1986) ont indiqué qu'en période de courant entrant, le sens de circulation des masses d'eau s'oppose au sens des aiguilles d'une montre (Figure I.3) formant une zone d'ombilic qui ravine toute la ligne côtière depuis le Nord-Ouest de « Jazira El Kebira » jusqu'au rivage de Menzel Abderrahmen. Par ailleurs, des études récentes (INSTM, 2000) détaillant la courantologie dans la lagune de Bizerte ont révélé que la circulation des eaux tant de surface que du fond suit la direction du vent dominant de Nord-Ouest. Toutefois, le déplacement des eaux de fond montre que les zones au nord et au sud de la lagune sont des régions de renouvellement de l'eau. La zone centrale du secteur d'étude s'avère le siège d'un faible hydrodynamisme.

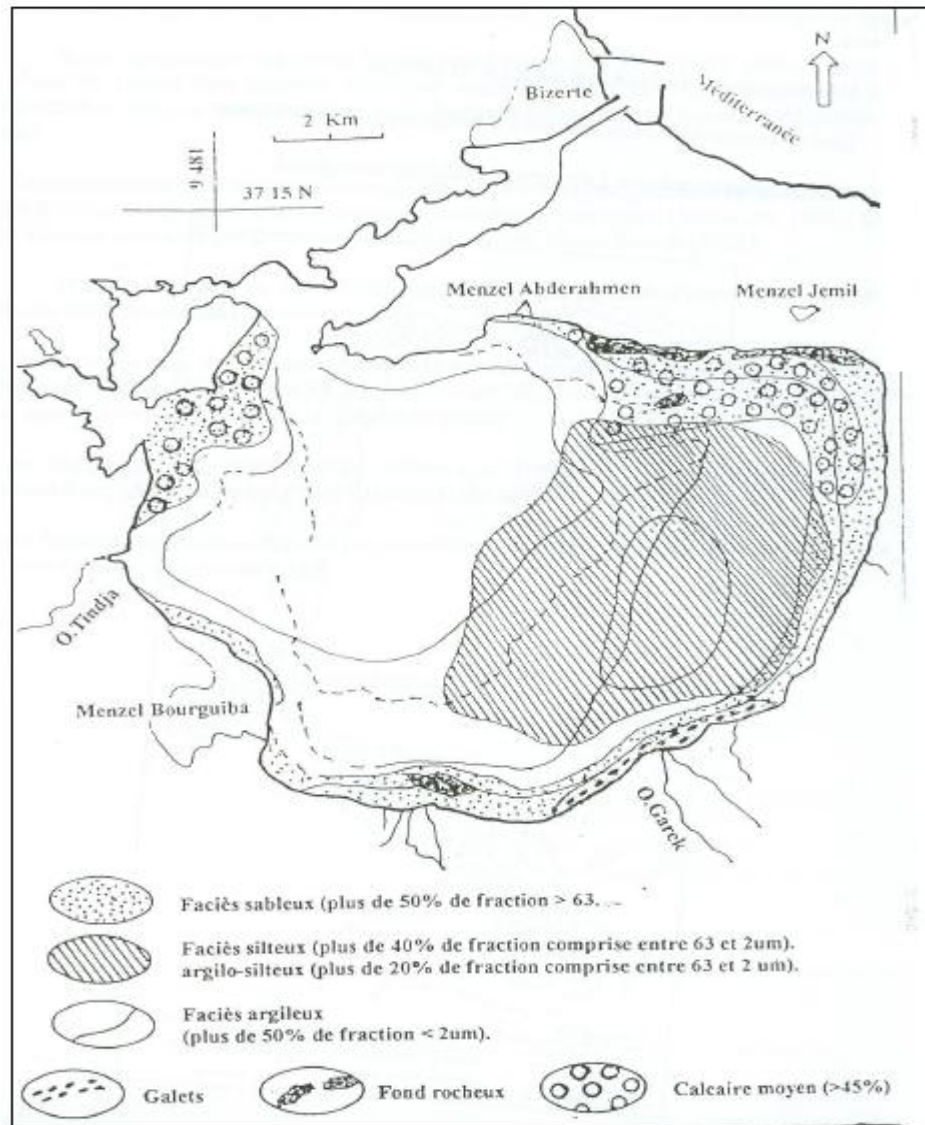


Figure 1.2 Carte des sédiments de la lagune de Bizerte (Soussi, 1983).

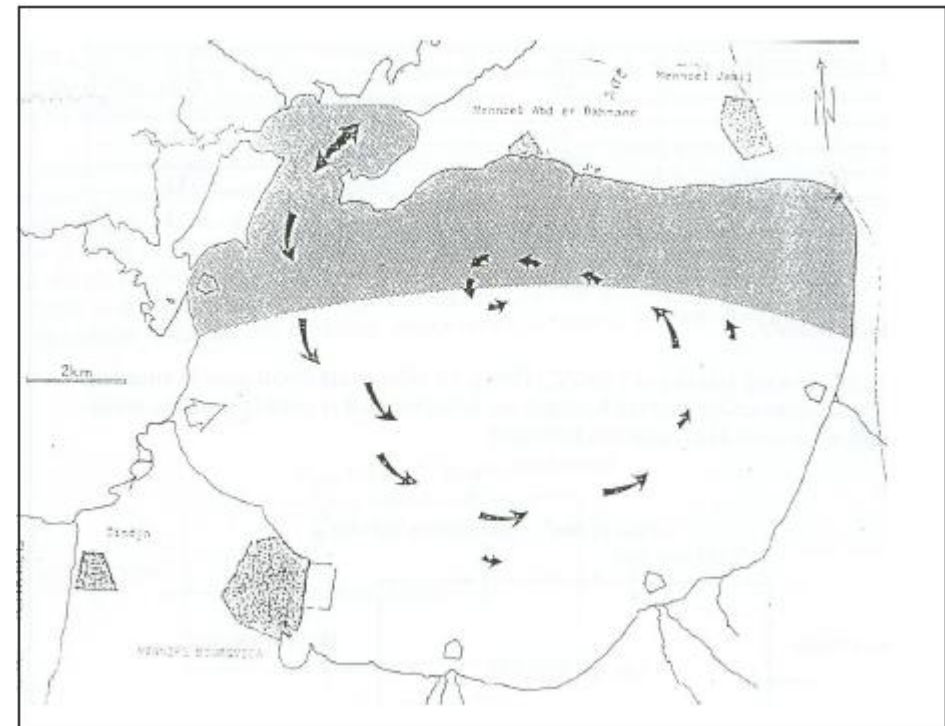


Figure 1.3 Schéma de la circulation des eaux et localisation des zones abritées selon Frisoni et al. (1986).

■ Zones abritées → Eaux lagunaires □ Eaux douces

II. Les contaminants organiques et métalliques dans l'environnement aquatique

Cette partie a pour but, de faire le point des connaissances actuelles sur la pollution marine par les contaminants organiques et métalliques et, particulièrement, ceux recherchés lors de ce travail, ainsi que leurs effets sur l'écosystème marin.

II.1 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

II.1.1 Structure chimique

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés organiques hydrophobes à base de carbone et d'hydrogène qui forment une vaste famille dont le nombre théorique s'élève à plus de 1000 (NIST, 2002), et dont la brique de base constituant ces entités est le noyau aromatique. Les HAP sont constitués de deux ou plusieurs cycles benzéniques juxtaposés qui peuvent être substitués et condensés. Cette condensation peut être linéaire, angulaire ou en amas. Le plus simple d'entre eux est le naphthalène (deux cycles) et le plus complexe est le coronène (sept cycles).

Selon leur poids moléculaire, les HAP peuvent être subdivisés en 2 sous groupes: les HAP de faible masse moléculaire et les HAP de masse moléculaire élevée. Il est communément admis que les HAP légers ont un nombre de cycles compris entre 2 et 3, alors que les HAP lourds sont composés de 4 à 6 cycles (Zeng et Vista, 1997; Wang et al., 1999).

Certains HAP sont plus étudiés en raison de leur impact sanitaire, comme le benzo(a)pyrène et les 15 autres HAP qui sont couramment analysés dans les différents composants de l'environnement, selon les recommandations de l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (US EPA, 1999) et dont les structures présentées sur la Figure I.4 illustrent également les principes de la nomenclature de ces derniers.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques soufrés (HAPS) appelés aussi HAP hétérocycliques, forment une classe de composés aromatiques polycycliques qui contiennent un ou plusieurs atomes de soufre dans l'un des cycles aromatiques. En dépit de leur composition différente, ils sont généralement intégrés à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Deux exemples d'hétérocycles soufrés étudiés dans le présent travail le dibenzothiophène (DBT) et le 2,1 Benzonaphtothiophene (2,1BNT) sont présentées sur la Figure I.4.

II.1.2 Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des HAP se révèlent très utiles pour évaluer le devenir potentiel de ces composés dans l'environnement et elles varient avec leur masse molaire et leur structure moléculaire (Tableau I.4). Excepté le naphthalène, les HAP sont peu volatils et se présentent à l'état pur sous forme de solide ou de liquide plus ou moins visqueux (Miège et al., 1999). Parallèlement, leurs coefficients de partage octanol/eau (Kow) sont relativement élevés, témoignant d'un important potentiel de bioconcentration dans les organismes (McElroy et Sisson, 1989). Par ailleurs, les composés alkylés sont plus hydrophobes que les composés parents (Kanan, 2012). L'arrangement des cycles de façon linéaire ou angulaire influence la stabilité des molécules, les HAP angulaires étant les plus stables et les linéaires les moins stables (Blumer, 1976; Bouchez et al., 1996; Kanaly et Harayama, 2000). De la même façon la présence de cycles à 5 atomes de carbone associé à des cycles benzéniques augmenterait la stabilité des molécules vis-à-vis de la biodégradation (Wammer et Peters, 2005).

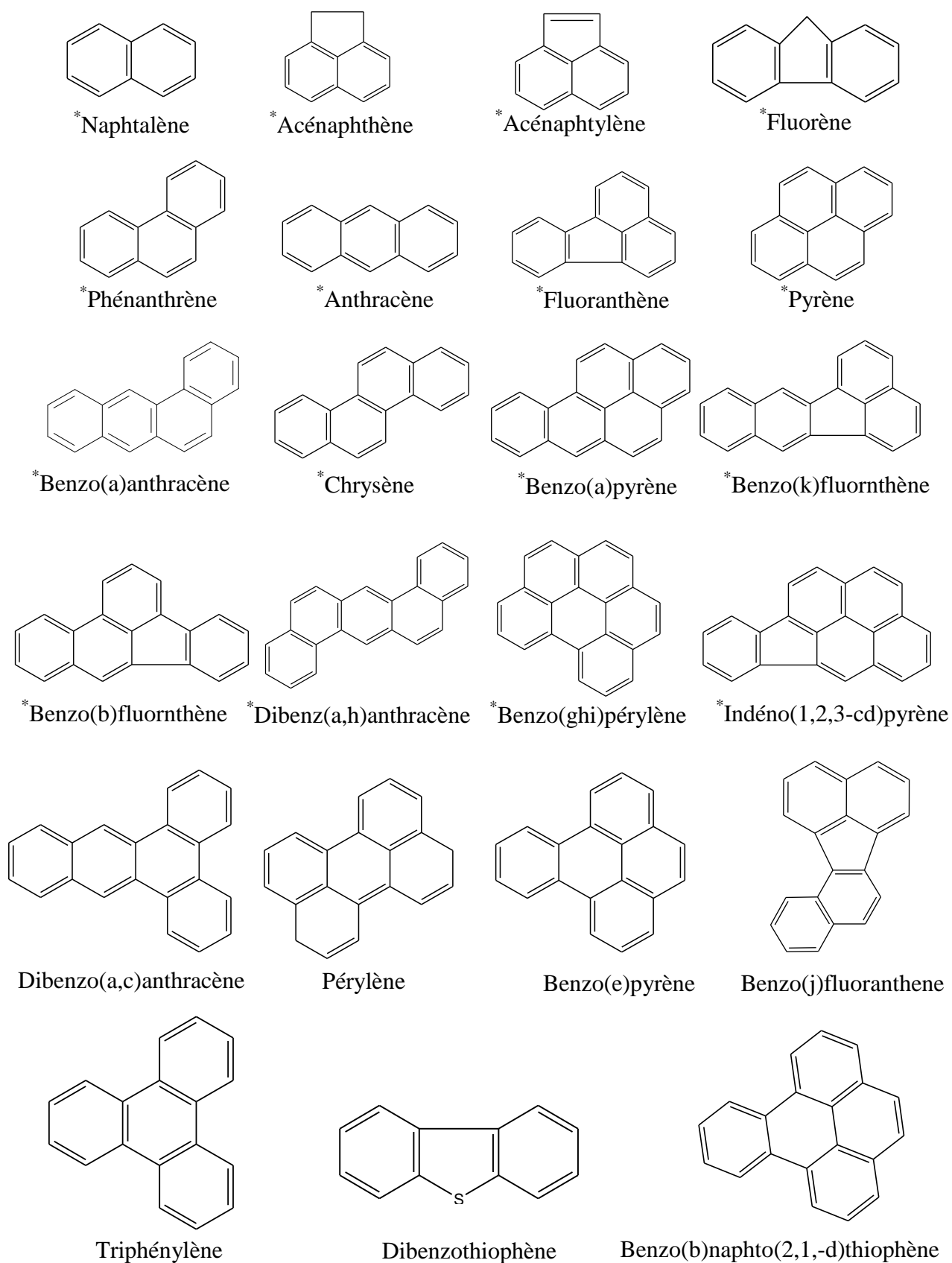


Figure I.4 Structures chimiques des HAP. [*Substances prioritaires selon l'agence de l'environnement des États-Unis d'Amérique (US-EPA)].

Tableaux I.4 Propriétés physico-chimiques des HAP.

HAP	Ab	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Pf ^a (° C) ⁽²⁾	Pe ^b (° C) ⁽¹⁾	Pvs ^c (Pa) ⁽⁹⁾	S ^d (mg.L ⁻¹) ⁽¹⁾	Log K _{OW} ^e ⁽¹⁾	Log K _{OC} ^f ⁽¹⁾	Log K _p ^g ⁽⁷⁾	Log K _{ea} ^h ⁽⁸⁾	Cste de Henry ⁱ (atm.m ³ /mol) ⁽¹⁾	Demi-vie dans les sols ⁽¹³⁾
Naphtalène	Nap	128	80,2	218	10,5 ⁽¹⁾	31,8	3,40 ⁽¹⁰⁾	3	1,7	1,7	483	20-50j ^(k)
Acénaphthylène	Acy	152	92,5	270	-	3,93 ⁽³⁾	3,61 ⁽¹¹⁾	-	-	-	-	-
Acénaphène	Ace	154	96,2	279	0,356 ⁽¹⁾	3,7	3,77 ⁽¹¹⁾	3,7	-	-	145	-
Fluorène	Fl	166	116	295	0,09	1,98	3,96 ⁽¹¹⁾	3,9	-	-	91	30-60j
Phénanthrène	Phe	178	101	340	0,018	1,2	4,57	4,2	2,73	2,8	39,3	2-200j
Anthracène	Ant	178	217,5	340,9	7,5.10 ⁻⁴	1,29	4,60 ⁽¹⁰⁾	4,4	2,73	3,5	49,7	2-20m ⁽¹⁾
Fluoranthène	Flu	202	110,5	384	1,2.10 ⁻³ ⁽¹⁾	0,26	5,1	4,9	3,7	3,7	6,5 ⁽⁵⁾	30-60j
Pyrène	Pyr	202	156	404	8,86.10 ⁻⁴	0,13	5,32	-	3,7	-	5 ⁽⁵⁾	1-5a ⁽¹⁾
Benz(a)anthracène	BaA	228	160,6	437	7,3.10 ⁻⁶	0,011 ⁽³⁾	5,31 ⁽¹²⁾	-	4,19	-	-	1-3a
Chrysène	Chry	228	255	448	5,7.10 ⁻⁷	0,002	5,81 ⁽²⁾	-	4,19	-	-	1-3a
Benzo(b)fluoranthène	BbF	252	168,3 ⁽³⁾	481	-	0,0012 ⁽³⁾	6,57	5,8	5	3,3	12 ⁽⁵⁾	1-2a
Benzo(k)fluoranthène	BkF	252	215,7 ⁽³⁾	480	6.10 ⁻⁷	0,00076	6,84	5,9	4,88	-	0,68	2-6a
Benzo(j)fluoranthène	BjF	252	166	-	-	0,0025 ⁽⁴⁾	6,44 ⁽⁶⁾	-	4,88	-	-	-
Benzo(e)pyrène	BeP	252	-	-	-	0,0063 ⁽⁴⁾	6,44 ⁽⁶⁾	-	4,88	-	0,4	-
Benzo(a)pyrène	BaP	252	176,5	496	7,3.10 ⁻⁷ ⁽¹⁾	0,002 ⁽⁵⁾	6,13 ⁽²⁾	6	4,88	4,2	-	2-20a
Pérylène	Per	252	-	-	-	0,003 ⁽⁴⁾	6,50 ⁽¹⁰⁾	-	4,88	-	0,9	-
Dibenz(a,h)anthracène	DahA	278	262 ⁽³⁾	524	3,7.10 ⁻¹	0,0005	6,7	6,1	5,65	5,6	-	1-2a
Dibenz(a,c)anthracène	DacA	278	-	-	1,3.10 ⁻⁹	0,023 ⁽⁴⁾	7,1 ⁽⁸⁾	-	5,65	-	-	-
Benzo(g,h,i)peryène	BP	276	273 ⁽³⁾	550	-	0,00026	6,5	-	-	-	-	1-2a
Indéno(1,2,3cd)pyrène	IP	276	163,6 ⁽³⁾	533	-	0,062	6,6	6,8	5,57	-	0,05 ⁽⁵⁾	1-2a

Référence : ⁽¹⁾ INERIS, 2003; ⁽²⁾ Schwarzenbach et al., 2003; ⁽³⁾ ATSDR, 1995; ⁽⁴⁾ Karcher et al., 1991; ⁽⁵⁾ ADEME, 1995; ⁽⁶⁾ Karcher, 1988; ⁽⁷⁾ Budavari et al., 1996; ⁽⁸⁾ Pearlman et al., 1984; ⁽⁹⁾ De Kruif, 1980; ⁽¹⁰⁾ Andersson et Schrader, 1999; ⁽¹¹⁾ Sahu et Pandit, 2003; ⁽¹²⁾ Jiang et al., 2012; ⁽¹³⁾ Wild et Jones, 1995.

Ab : abréviation, ^a Pf : point de fusion, ^b Pe : point d'ébullition, ^c Pvs : pression de vapeur saturante à 25 °C, ^d S : Solubilité dans l'eau à 25 °C, ^e K_{OW} : coefficient de partage n-octanol/eau, ^f K_{OC} : Coefficient de partage carbone organique/eau, ^g K_p : coefficient de partage carbone sédiment/eau, ^h K_{ea} : coefficient de partage eau/air, ⁱ constante de Henry à 25 °C, ^k j : jours, ^l a : années, ^j m : mois.

II.1.3 Principales sources d'émission

Les HAP sont en général présents dans l'environnement sous forme de mélanges. Ils sont produits lors de la combustion incomplète des matières organiques à hautes températures ou des processus de pyrolyse (Costes et Druelle, 1997; INERIS, 2000) et ont des origines naturelles et anthropiques.

II.1.3.1 Sources naturelles

Les processus biogéniques ou naturels de génération des hydrocarbures sont divers. Parmi eux, les feux de forêt et de prairie sont considérés comme les plus importants. Mais, il existe d'autres processus tels que les éruptions volcaniques, l'érosion des roches, les fuites de réservoirs naturels ainsi que la production d'hydrocarbures par les végétaux supérieurs (cires) ou par les algues et les réactions biogènes dans les plantes et les bactéries (Juhasz et Naïdu, 2000; Wilcke, 2000), mais aussi dans les résines et les déchets microbiens (Colombo et al., 1989; Bomboi et Hernandez, 1991; Aboul-Kassim et Simoneit, 1995). En outre, certaines sources cosmiques de HAP ont été également proposées (Wing et Bada, 1992; Beegle et al., 2001) comme les chondrites carbonées. Dans ce dernier les HAP semblent être le produit d'une synthèse à haute température. Cependant, les conditions météorologiques (comme le vent, la température et l'humidité) et le type de carburant (par exemple la teneur en eau, de bois vert ou sèche) jouent un rôle important dans le niveau de production naturelle de HAP.

II.1.3.2 Sources anthropiques

Deux sources anthropiques sont généralement distinguées: d'une part les sources pétrolières, correspondant à une pétrogenèse à basse température, et d'autre part les sources pyrolytiques correspondant à des processus de combustion à haute température. Les principales sources d'émission atmosphériques sont le chauffage (charbon, bois ou fuel domestique) et les transports routiers. En Suède, la combustion du bois a été estimée à 430 Kg de B(a)P en 1994 (Bostrom et al., 1999). Le taux d'émission de HAP par les systèmes de chauffages domestique sont fortement influencés par la nature du combustible utilisé (type de bois, de fuel, de gaz, de la présence de feuillage) et les conditions de combustion, comme la température, l'humidité, et la disponibilité de l'oxygène (Standley et Simoneit, 1987; Jenkins et al., 1996). Concernant les industries, les principaux émetteurs de HAP sont les industries chimiques, de la fonte, de la métallurgie, mais aussi les activités de production de coke, d'aluminium, la créosote et de préservation du bois, de produits chlorés, ou encore d'insecticides, fongicides, antiseptiques et désinfectants. L'émission de HAP peut également

avoir lieu pendant l'incinération des déchets, la fabrication du ciment, dans la pétrochimie et des industries connexes, la fabrication du caoutchouc des pneus, la production commerciale de chaleur/énergie (PAH Position paper, 2001).

Les activités humaines rejettent aussi des HAP à travers certaines pratiques:

- Le tabagisme: Plus de 150 HAP ont été trouvés dans la fumée de tabac (Lee et al., 1976) et pourrait être impliqués dans les effets néfastes du tabac sur la santé (Boyle, 1997). La consommation d'un paquet de cigarettes apporte entre 2 et 5 μg d'HAP par jour (Phillips, 1999);
- Certaines pratiques alimentaires: Les aliments grillés et fumés sont connus pour contenir les plus forts taux d'HAP, de l'ordre de 165 ng. g^{-1} .

II.1.4 Caractérisation des sources de HAP

Les diverses conditions de formation des HAP (température, type de combustible, maturation, processus biologiques mis en jeu...) génèrent des hydrocarbures ayant une empreinte caractéristique (Rocher, 2003). Ces différences ont permis le développement d'outils de diagnostic spécifiques afin de déterminer, dans une certaine mesure, les origines de la contamination du milieu marin. Ces indices moléculaires seront également détaillés dans le chapitre II et IV au fur et à mesure de leur application à nos sédiments et nos organismes marins.

Les environnements principalement marqués par des pollutions pétrogéniques présenteront une prédominance des HAP substitués vis-à-vis des HAP parents, ainsi que des HAP de faible poids moléculaire (2 et 3 cycles aromatiques). Les températures relativement basses (inférieures à 200 °C), atteintes lors de la lente maturation de la matière organique, favorisent la préservation des HAP de faibles poids moléculaires et substitués. Inversement, les HAP provenant des processus pyrolytiques à hautes températures (activité industrielle: 1500-2000 °C) présentent des profils caractérisés par une prédominance des composés parents et des HAP de hauts poids moléculaire (4, 5 et 6 cycles aromatiques) (Baumard, 1997). Le rapport entre les HAP légers et les HAP lourds (low Molecular Weight / High Molecular Weight : LMW / HMW) est couramment utilisé afin de distinguer les origines pétrolière (rapport élevé) et pyrolytique (rapport faible) de la contamination (Rocher, 2003; De Luca et al., 2004).

Les différences de stabilité thermodynamique des composés ont également été appliquées à plusieurs couples d'isomères comme le phénanthrène et l'anthracène, le pyrène et le fluoranthène, le benzo(a)anthracène et le chrysène. L'utilisation de ces indices moléculaires repose sur le fait que les isomères possèdent des propriétés physico-chimiques similaires et,

qu'après leur émission, ils vont subir des processus de dégradation ou de dilution dans un même ordre de grandeur (Zhang et al., 2005). Par ailleurs, ces rapports caractéristiques sont le plus souvent étudiés simultanément afin d'éviter les erreurs d'interprétation (Budzinski et al., 1997; Yunker et al., 2002). Ces rapports caractéristiques ont été mis en pratique dans de nombreuses études (Colombo et al., 1989; Wang et al., 1999; De Luca-Abbott et al., 2005; Jeanneau et al., 2006). Toutefois l'utilisation de tels rapports ne suffit pas pour une identification univoque des sources de HAP dans l'environnement marin. En effet, les HAP peuvent subir différents processus physico-chimiques et biologiques dans le milieu marin qui altèrent leur empreinte moléculaire originelle (Bayona et al., 1986; Budzinski et al., 1998).

Le Tableau I.5 présente les HAP prédominants en fonction des différentes sources (Masclat et al., 1984).

Tableau I.5 HAP prédominants dans les émissions de différentes sources.

HAP	Chauffage domestique	Véhicule à essence	Véhicule diesel	Usine engrais	Raffinerie pétrole	Centrale électrique à charbon	Usine d'incinération de déchets	Fonderie
Ft					X	X		
Phe			X	X	X	X	X	
An					X			
Fl	X		X	X		X		X
Py	X		X		X		X	
B(a)An	X			X				X
Chy	X						X	
B(b)Ft								X
B(k)Ft								
B(a)Py		X						X
B(g,h,i)								
Pe								
In		X						

II.1.5 Toxicité des HAP

En dehors du fait que l'exposition aux HAP est ubiquitaire, l'étude de l'exposition aux HAP est difficile pour plusieurs raisons: les HAP se présentent souvent sous la forme de mélanges dont la composition dépend de la matière brute et des conditions de combustion. Il devient ainsi particulièrement délicat de déterminer le risque attribué à chacun des HAP pris séparément. Par ailleurs, les HAP environnementaux étant adsorbés sur des particules de différentes natures, les données épidémiologiques ne peuvent pas évaluer le rôle de ces interactions dans la genèse de tel ou tel toxicité.

La toxicité des HAP dépend très fortement de la molécule et de la dose considérées (Aboul-kassim et Simoneit, 1995), certains sont faiblement toxiques, alors que d'autres, comme le benzo(a)pyrène, sont cancérrogènes (INERIS, 2004).

Dans le milieu aquatique la toxicité des HAP est en relation directe avec leur biodisponibilité et leur facteur de bioaccumulation (ou de bioconcentration) au sein des organismes.

Les principaux effets toxiques des HAP sont la cancérogénicité, la génotoxicité, tératogénécité (Barbieri et al., 1986; De Flora et al., 1991), ainsi qu'une immunotoxicité chez le biota (Dean et al., 1983; Blanton et al., 1986; Deal, 1995; Klaasen, 1997). De plus, certains HAP sont aussi suspectés de modifier l'activité du système endocrinien (Lintelmann et al., 2003).

Les HAP peuvent être à l'origine d'une toxicité aiguë et surtout d'une toxicité chronique.

II.1.5.1 Toxicité aiguë

La toxicité aiguë est évaluée par une brève exposition d'un organisme à une substance chimique à forte dose. Ces tests permettent d'établir des valeurs de CL50 (concentration létale). La CL50 est la concentration d'une substance déduite statistiquement qui devrait provoquer au cours d'une exposition ou, après celle-ci, pendant une période définie, la mort de 50% des animaux exposés pendant une durée déterminée. La toxicité aiguë des HAP est faible à modérée.

Chez l'animal (rats), par ingestion, les quelques CL50 publiées montrent une faible toxicité. Par inhalation, il n'a pas été décrit d'effet particulier en aiguë, mais les données fiables sont très rares.

Chez les poissons les différentes études réalisées ont montré une toxicité plus forte des HAP de haut poids moléculaire (Oris et Giesy, 1987). Ainsi des tests réalisés sur *Pimephales promelas* (cyprinidé, poisson d'eau douce) ont montré des valeurs de CL50 de 7900 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le Nap et de 1,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le B[a]A. Chez les embryons de turbot *Psetta maxima*, les CL50 rapportées respectivement pour le Pyr, le fluoranthène, le phénanthrène et le naphthalène sont de 5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 12,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 52,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 142 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Mhadhbi et al., 2010). Chez deux espèces de poissons, le saumon rose *Oncorhynchus gorbuscha* et le hareng du Pacifique *Clupea pallasii*, une augmentation de la mortalité a également été observée dès des concentrations en HAP totaux de 0,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivement, démontrant ainsi que la toxicité aiguë des HAP peut se manifester à des concentrations environnementales de l'ordre du ppb (Carls et al., 1999; Heintz et al., 1999).

II.1.5.2 Toxicité chronique

La toxicité chronique est évaluée par une exposition faible d'un organisme à une substance chimique sur une longue durée. Ces tests permettent d'établir des valeurs de NOEC (No Observed Effect Concentration) et LOEC (Lowest Observed Effect Concentration). La NOEC correspond à la plus forte concentration testée n'entraînant pas d'effet statistiquement significatif par rapport au témoin. La LOEC correspond à la plus faible concentration testée entraînant un effet statistiquement significatif par rapport au témoin. Comme pour la toxicité aiguë, chez les poissons, les HAP de haut poids moléculaire présentent une toxicité chronique plus forte: valeur de NOEC de 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le Nap et de 5,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'Ant (Oris et Giesy, 1987).

Très peu d'effets systémiques ont été décrits pour les HAP. Chez la souris, l'administration de fluoranthène par voie orale pendant 13 semaines (250 mg/kg/j chez la femelle, 500 mg/kg/j chez le mâle) a engendré au niveau du rein une régénération tubulaire, un infiltrat interstitiel lymphocytaire ainsi qu'une fibrose (EPA, 1988).

La contamination par les HAPs entraîne chez les poissons une perturbation de différentes fonctions immunitaires telle que l'activité du lysozyme, les capacités de phagocytoses, la régulation de l'apoptose ou encore la prolifération cellulaire (Reynaud et Deschaux, 2006). Par exemple, Danion et al. (2011) observe chez des bars communs (*Dicentrarchus labrax L.*) une diminution du nombre de lymphocytes, une augmentation de la mortalité des leucocytes et une diminution des capacités de phagocytose après 21 jours de contamination aux hydrocarbures.

L'altération du développement est fréquemment rapportée dans la littérature chez les stades embryonnaires et larvaires de poisson après exposition à des HAP. De nombreuses études rapportent une réduction du succès d'éclosion et de la durée du développement embryonnaire après exposition à des HAP (Rhodes et al., 2005; Hendon et al., 2008; Mhadhbi et al., 2010). L'inhibition du taux d'éclosion peut atteindre 70 % dans le cas de mélanges tertiaires de HAP parents ou diméthylés (Rhodes et al., 2005). Inversement, certains HAP tels que le fluoranthène peuvent engendrer un retard d'éclosion chez les embryons de Medaka exposés à des sédiments dopés (Vicquelin, 2011).

L'exposition des poissons aux HAP à des stades précoces de développement peut engendrer l'apparition de malformations. En effet, certains composés comme, par exemple, le phénanthrène, le diméthylphénanthrène et le rétène, peuvent causer des effets tératogènes

chez 100 % des larves de truite et de Madaka japonais exposées (Brinkworth et al., 2003; Turcotte et al., 2011).

Le plus souvent, le pouvoir tératogène des HAP se manifeste par des altérations cranio faciales, cardio-vasculaires et du squelette axial (Billiard et al., 1999; Incardona et al., 2004; Wassenberg et al., 2005; Hendon et al., 2008; Mhadhbi et al., 2010). Certains effets comme l'apparition d'oedèmes péricardiques et périvitellins, d'hémorragies, de malformations de la mâchoire inférieure et de la colonne vertébrale (scoliose ; lordose), de perturbations de la fonction cardiaque (Billiard et al., 1999; Brinkworth et al., 2003; Incardona et al., 2004; Incardona et al., 2006) rappellent les symptômes observés après exposition d'embryons à la TCDD (Hornung et al., 1999; Kim et Cooper, 1999; Brinkworth et al., 2003; Incardona et al., 2004; Antkiewicz et al., 2005), baptisés maladie du sac bleu ou BSD (blue sac disease).

Les travaux d'Incardona et al. (2004,2005) ont démontré que les HAP tricycliques tels que le phénanthrène, le fluorène et le dibenzothiophène, étaient directement cardiotoxiques chez les embryons de *D. rerio*.

II.1.6 Approche par les Facteurs d'Equivalence Toxique (TEF)

Le concept de facteur d'équivalence toxique (TEF) a émergé en 1977 dans le but d'établir une valeur toxicologique de référence pour des effets cancérigènes induits par un mélange de composés chimiquement proches. D'abord appliqué aux dioxines, il a été ensuite étendu aux HAP. Ces TEF sont des coefficients de pondération qui expriment la toxicité relative de chaque substance de manière individuelle par rapport à la substance de référence de la famille (ici le benzo[a]pyrène) auquel on assigne un TEF de 1. Dans cette approche, on considère (1) que les doses et les effets de chacun des composés du mélange sont additifs, (2) qu'il n'existe pas d'interactions antagonistes ou synergiques entre les composés du mélange et (3) qu'ils agissent selon le même mécanisme d'action toxique. Cette approche permet de sommer les concentrations des HAP d'un mélange en les pondérant par des TEF établis par rapport à un HAP considéré comme référence (B[a]P). Cette valeur est exprimée par la quantité en équivalent toxique (TEQ).

$$TEQ = \sum ([HAP_n] \times TEF_n)$$

n: nombre de composés détectés dans un échantillon.

Il convient de noter cependant que les études expérimentales disponibles sur des HAP pris individuellement ou en mélange montrent que les trois hypothèses citées précédemment ne sont pas réunies dans le cas des HAP, l'application de ce concept peut conduire à une

surestimation ou à une sous-estimation du risque. Pour être incluses dans l'approche TEF, les molécules doivent remplir les critères suivants:

- Structure chimique proche des polychlorodibenzo-p-dioxines et dibenzofuranes (PCDD/F);
- Liaison au récepteur AhR;
- Induction, via cette liaison à AhR, de réponses biochimiques et toxiques similaires aux PCDD/F;
- Propriétés de persistance et de bioaccumulation.

Le Tableau I.6 donne un exemple des valeurs d'équivalent toxique pour 14 HAP largement étudiés.

Tableau I.6 Facteurs d'équivalence toxique (TEF) des HAP individuels (Nisbet et LaGoy, 1992).

HAP	TEF
Naphtalène	0,001
Fluorène	0,001
Phénanthrène	0,001
Anthracène	0,01
Fluoranthène	0,001
Pyrène	0,001
Benz(a)anthracène	0,1
Chrysène	0,01
Benzo(b)fluoranthène	0,1
Benzo(k)fluoranthène	0,1
Benzo(a)pyrène	1
Indéno(1,2,3cd)pyrène	0,1
Dibenz(a,c)anthracène	1
Benzo(g,h,i)pérylène	0,01

II.1.7 Réglementations

Du fait du caractère toxique des HAP, il est important de légiférer sur les teneurs maximales admissibles pour éviter tout risque environnemental ou humain. En ce qui concerne les eaux, L'organisation Mondiale pour la Santé (OMS) définit les limites pour l'eau potable à 5 µg. L⁻¹ pour le Fluoranthène et 0,7 µg. L⁻¹ pour le Benzo(a)Pyrène.

A l'heure actuelle, il n'existe pas en France, comme en Tunisie de réglementation sur les teneurs en HAP dans les sols. En Tunisie, les seules données existantes sur la pollution par les hydrocarbures sont fournies par l'Agence National du Protection de l'Environnement

(ANPE). L'US EPA a classé seize HAP à rechercher en priorité; Le Fluorène, le Fluoranthène et le Pyrène.

En fonction du caractère cancérigène prouvé ou supposé, les HAP sont classés différemment. Le Tableau I.7, présente les différentes classifications de l'UE (Union Européenne), du CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) et de l'US EPA pour les HAP (Lafon et al., 2000). Dans le même tableau sont indiqués également leurs effets nocifs, répertoriés dans le registre des effets toxiques des substances chimiques.

Tableau I.7 Classification des 16 HAP cancérigènes par différentes organisations (Topal, 2004).

Nature chimique des substances	UE	CIRC IARC	US EPA	RTECS
Naphtalène			<i>C</i>	<i>T, M, R</i>
Acénaphthylène			<i>D</i>	<i>M</i>
Acénaphène				<i>M</i>
Fluorène			<i>D</i>	<i>T, M</i>
Phénanthrène			<i>D</i>	<i>T, M, E</i>
Anthracène			<i>D</i>	<i>T, M, E</i>
Fluoranthène			<i>D</i>	<i>T, M, E</i>
Pyrène			<i>D</i>	<i>T, M, E</i>
Benzo(a)Anthracène		2A	B2	<i>T, M, C</i>
Chrysène	Cat 2-R45		B2	<i>T, M, E</i>
Benzo(b)Fluoranthène	Cat 2-R45	2B	B2	<i>T, M, C</i>
Benzo(k)Fluoranthène	Cat 2-R45	2B	B2	<i>T, M, E</i>
Benzo(a)Pyrène		2A	B2	<i>T, M, R, C</i>
Dibenzo(a,h)Anthracène	Cat 2-R45	2A	B2	<i>T, M, C</i>
Benzo(g,h,i)Pérylène			<i>D</i>	<i>T, M</i>
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	Cat 2-R45	2B	B2	<i>T, M, C</i>

CIRC :*I*: Cancérogène pour l'homme*2A*: Probablement cancérogène pour l'homme*2B*: Possiblement cancérogène pour l'homme*3*: Inclassable**Union Européenne :***A*: Cancérogène pour l'homme*B1 et B2*: Cancérogène probable pour l'homme*C*: Cancérogène possible pour l'homme*D*: Inclassable*E*: Probablement non cancérogène**US EPA :***C*: Cancérogène*M*: Mutagène*R*: Affecte l'appareil reproducteur*T*: Conduit à l'apparition de tumeur*E*: Rôle probable dans l'apparition de tumeurs**Etiquetage européen des substances : R45:** peut causer le cancer**RTECS:***Cat 1*: Substance cancérogène pour l'homme*Cat 2*: Substance assimilée à des substances cancérogènes pour l'homme*Cat 3*: Substance préoccupante pour l'homme en raison d'effets cancérogènes possibles

II.2 Les polychlorobiphényles (PCB)

Les PCBs sont des composés organiques de synthèse. Ils ont été découverts pour la première fois dans l'environnement en 1966 par Jensen. Depuis, de nombreux auteurs ont montré leur présence un peu partout dans notre environnement, en particulier dans les organismes vivants, où ils ont tendance à s'accumuler dans les tissus adipeux (Abarnou et al., 2000).

II.2.1 Structures chimique et nomenclature

Le terme de PCB désigne une famille de composés organochlorés de haut poids moléculaire de formule chimique $C_{12}H_{(10-n)}Cl_n$, dans laquelle le nombre d'atomes de chlore (n) peut varier entre 1 et 10. Suivant le nombre et la position des atomes de chlores substitués sur la molécule du biphenyle (Figure I.5), il y a la possibilité d'avoir théoriquement 209 congénères différents.

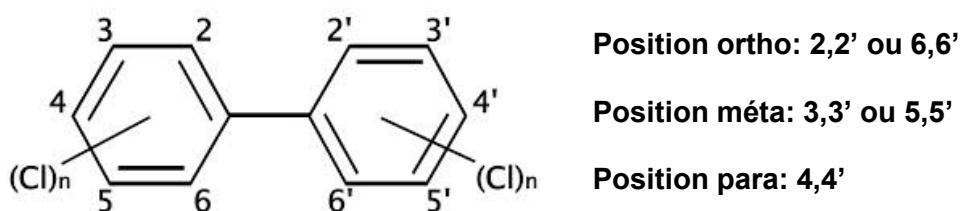


Figure I.5 Structure générale d'un PCB.

Ils sont synthétisés en deux étapes. La première est l'obtention du noyau biphenyle par déshydrogénation de deux molécules de benzène à 800 °C. La seconde, est une chloration directe du biphenyle en présence d'un catalyseur (chlorure ferrique ou limaille de fer) à 150 °C (Figure I.6).

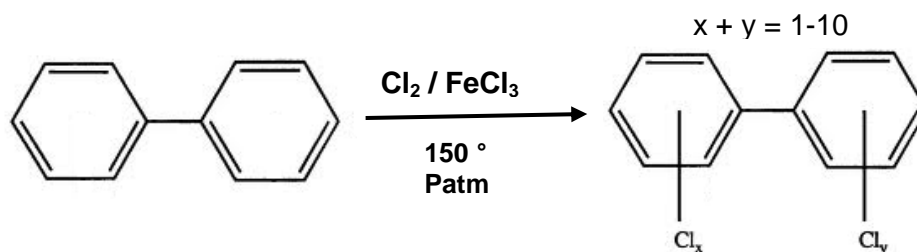


Figure I.6 Production des polychlorobiphényles par chloration catalysée du biphenyle.

Tableau I.8 Nombre d'isomères possibles de PCBs.

Substitutions chlorées	Formules	Nombre d'isomères
Monochlorobiphényles	C ₁₂ H ₉ Cl	3
Dichlorobiphényles	C ₁₂ H ₈ Cl ₂	12
Trichlorobiphényles	C ₁₂ H ₇ Cl ₃	24
Tétrachlorobiphényles	C ₁₂ H ₆ Cl ₄	42
Pentachlorobiphényles	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	46
Hexachlorobiphényles	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	42
Heptachlorobiphényles	C ₁₂ H ₃ Cl ₇	24
Octachlorobiphényles	C ₁₂ H ₂ Cl ₈	12
Nonachlorobiphényles	C ₁₂ HCl ₉	3
Décachlorobiphényles	C ₁₂ Cl ₁₀	1

Le degré de substitution et la position des atomes de chlore permettent de définir la nomenclature régissant les PCB. Cette nomenclature de l'International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) est décrite en détail dans le figure I.7 (Ballschmitter et Zell, 1980). Elle permet d'attribuer un chiffre de 1 à 209 aux différents congénères en fonction de la numérotation des atomes de carbone substitués par les chlores. Par exemple, le congénère qui possède 4 atomes de chlore sur les carbones 2, 3, 4 et 3' est noté PCB 233'4 et porte le numéro 55.

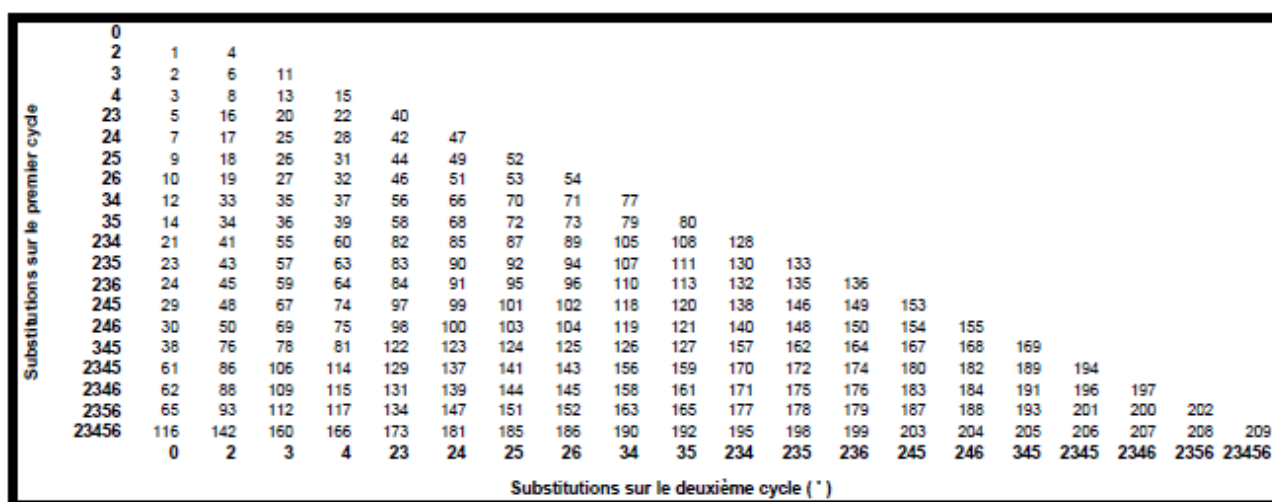


Figure I.7 Nomenclature des différents congénères de PCB (Ballschmiter et Zell, 1980).

II.2.2 Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques de chaque congénère de PCB ainsi que leur pouvoir toxique sont déterminés par leurs caractéristiques structurales (Tableau I.9). Selon le taux de chlore, les PCB se présentent sous forme huileuse ou résineuse pour les mélanges les plus chlorés. Leur densité est supérieure à 1. Ils sont incolores ou jaunâtres, toujours selon le taux de chlore, et possèdent une odeur aromatique caractéristique (INERIS, 2005).

Dans l'industrie, la grande variété d'applications des PCB est imputable à leur grande stabilité thermique (augmente avec le nombre d'atomes de chlore, il faut des températures supérieures à 300 °C pour qu'ils se dégradent), à leur faible inflammabilité mais aussi à leur point d'ébullition élevé et leur faible tension de vapeur. Ces propriétés expliquent l'utilisation principale en tant qu'isolants et diélectriques dans les transformateurs et les condensateurs.

Par ailleurs, les PCB possèdent des propriétés, qui influencent leurs activités sur les plans environnemental, biologique et expliquent leur toxicité chez l'humain, c'est-à-dire une grande stabilité chimique, une faible solubilité dans l'eau, une grande lipophilie ainsi qu'une tendance à la bioaccumulation. Les PCB les moins chlorés commencent à se décomposer à partir de 300 °C pour former du chlorure d'hydrogène (HCl), du dioxyde de carbone (CO₂) et de l'eau (H₂O) (Mhiri et de Marsac, 1997). La pyrolyse des PCB est optimale à une température supérieure à 650 °C. Si la combustion a lieu dans des conditions de températures inférieures en présence d'oxygène, il y aura alors formation de polychlorodibenzo-dioxines (PCDD) et de polychlorodibenzo-furanes (PCDF) (INRS, 2007).

Nous avons décidé de récapituler les principales données physico-chimiques sous forme de moyenne pour chaque groupe d'isomères au sein du Tableau I.9. En effet, les propriétés varient principalement en fonction du degré de chloration des molécules même si la position des atomes joue elle aussi un rôle important.

Table I.9 Principales données physico-chimiques des PCB pour chaque groupe d'isomères (données uniques sont des moyennes) (sources: Larry. W Robertson, L.G Hansen « PCBs: recent advances in environment toxicology and health aspects » - 2001 United Environment Programme: rapport sur les polluants organiques persistants).

Groupe de congénères	Poids moléculaire (g/mol)	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)	Pression de vapeur (Pa) à 25 °C	Solubilité à 25°C (g/m ³)	Coefficient de partage octanol/eau logKow	Taux d'évaporation approximatif à 25°C (g/(m ² /h))
Monochlorobiphényle	188,7	25–77,9	285	0,9–2,5	1,21–5,5	4,3–4,6	0,25
Dichlorobiphényle	223,1	24,4–149	312	0,008–0,6	0,06–2	4,9–5,3	0,065
Trichlorobiphényle	257,5	28,87	337	0,003–0,22	0,015–0,4	5,5–5,9	0,017
Tétrachlorobiphényle	292	47–180	360	0,002	0,0043–0,01	5,6–6,5	4,2.10 ⁻³
Pentachlorobiphényle	326,4	76,5–124	381	0,0023–0,051	0,004–0,02	6,2–6,5	10 ⁻³
Hexachlorobiphényle	360,9	77–150	400	0,0007–0,012	0,0004–0,0007	6,7–7,3	2,5.10 ⁻⁴
Heptachlorobiphényle	395,3	122,4–149	417	1,3.10 ⁻⁴	0,000045	6,7–7	6,2.10 ⁻⁵
Octachlorobiphényle	429,8	159–162	432	2,8.10 ⁻⁵	0,0002–0,0003	7,1	1,5.10 ⁻⁵
Nonachlorobiphényle	464,2	182,8–206	445	6,3.10 ⁻⁶	0,00018–0,0012	7,2–8,16	3,5.10 ⁻⁶
Décachlorobiphényle	498,7	305,9	456	1,4.10 ⁻⁶	0,000001	8,26	8,5.10 ⁻⁷

II.2.3 Sources de pollution

Les molécules de PCB sont d'origine anthropique uniquement. Elles ont été synthétisées pour la première fois en 1881, leur production industrielle commençant en 1929 aux Etats-Unis. Dans les années 1960-1970, la production annuelle mondiale était de 100,000 tonnes. Actuellement, les estimations les plus précises font état d'une charge minimale globale en PCB dans les océans de 230,000 tonnes. Dès lors, on peut conclure que la quantité encore en usage aujourd'hui, soit 800,000 tonnes environ, représente 4 fois le total des PCB présents dans l'environnement océanique (Tanabe et Tatsukawa, 1986). En raison de leurs caractéristiques physico-chimiques, les mélanges techniques de PCB ont été utilisés dans le cadre d'une multitude d'applications. On décrit trois grands types d'utilisation des PCB en fonction de leur impact sur l'environnement (Dobson et Van Esch, 1993):

→ **les systèmes clos contrôlables**: équipements électriques (transformateurs, gros condensateurs). Les problèmes de contamination de l'environnement ne se posent qu'en cas de fuite accidentelle ou lors de la mise au rebut de l'appareil;

→ **les systèmes clos non contrôlables**: systèmes hydrauliques et systèmes d'échange thermique. Cette application concerne les PCB en faibles quantités dans de nombreux condensateurs (tubes fluorescents, moteurs, émetteurs radio...), des redresseurs, des régulateurs de tension... qu'il est impossible de récupérer quand le matériel est hors d'usage, et qui se trouvent alors dispersés;

→ **les systèmes ouverts**: agents plastifiants et anticorrosifs dans les peintures et vernis, agents lubrifiants dans les huiles de graissage, agents améliorateurs des plastiques et polymères, mais aussi dans les caoutchoucs, les adhésifs, les encres d'imprimerie, les papiers, les savons et les insecticides. Les PCB sont en contact direct avec l'environnement et donc irrécupérables.

II.2.4 Toxicité

Les propriétés toxiques des différents congénères de PCBs dépendent de leurs propriétés physico-chimiques, et en particulier du nombre de substitution par des atomes de chlore et de leur position sur le biphenyle. Les plus toxiques des 209 congénères de PCB sont les composés coplanaires. L'étude des relations structure/activité (Boon et al., 1989; Kannan et al., 1995) suggère que les composés non ortho-chlorés (par exemple: 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyle, ou CB77; 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyle, ou CB126; et 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyle ou CB169) sont capables d'adopter une configuration plane et de se

comporter de la même manière que la dioxine (composé hautement toxique: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin ou TCDD). La toxicité de ces congénères vient de leur capacité à se lier et à activer le récepteur AhR. Pour cette raison, les congénères non ortho-substitués, dits « dioxine-like » (DL), présentent les plus fortes toxicités, suivis par les composés mono-orthosubstitués, modérément toxiques, alors que les congénères di-ortho-substitués présentent les plus faibles toxicités.

Les PCB sont responsables de toxicités aiguës et chroniques sur les organismes vivants (Figure I.8).

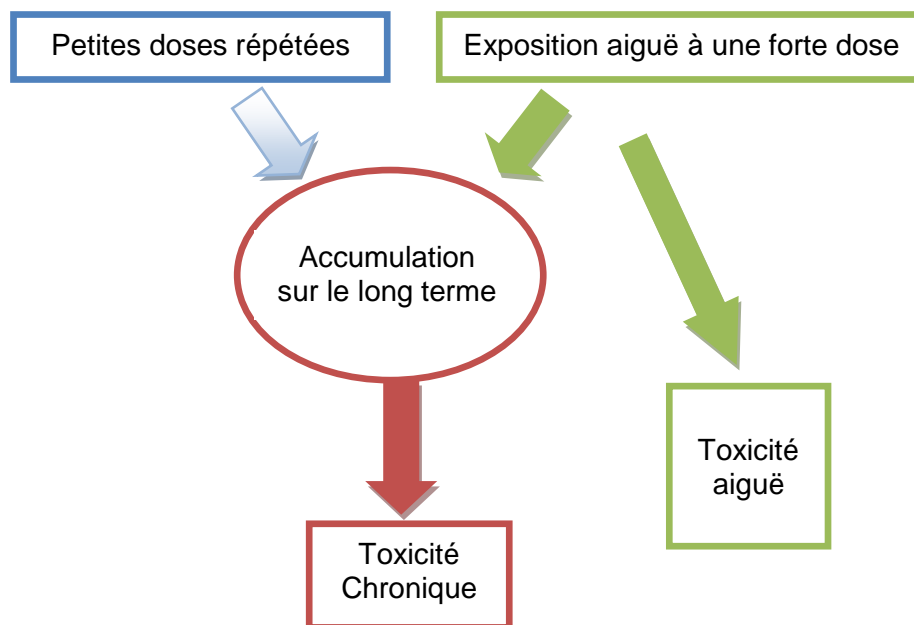


Figure I.8 Représentation des différentes toxicités des PCB (modifié Cornu, 2012).

II.2.4.1 Toxicité aiguë

En raison de la faible solubilité dans l'eau, la toxicité aiguë des PCB est faible pour les organismes aquatiques (US EPA, 1980). Chez les poissons des valeurs de CL50 de 0,015 mg/L et 2,74 mg/L ont été enregistrées après 96 heures d'exposition de *Pimephales promelas* et de *Lepomis macrochirus*, respectivement. Les signes observés lors des expérimentations varient selon les espèces et les voies d'assimilation. Suite à des fortes concentrations d'exposition, on observe de l'acné, des irritations cutanées, une hyperpigmentation, une hypersécrétion des glandes lacrymales, une conjonctivite, des atteintes hépatiques (hypertrophie et modification enzymatique), rénaux et hématologiques (anémie et hyperleucocytose) (INRS, 2007).

II.2.4.2 Toxicité chronique

Les PCB provoquent de nombreux effets sur les organismes exposés, parmi lesquels l'altération de l'osmo-régulation et de l'iono-régulation, de la nutrition, de la fonction immunitaire, du système endocrinien, du développement et de l'intégrité génétique (Lawrence et Hemingway, 2003). La perturbation du système endocrinien (hormones thyroïdiennes et gonadiques) va engendrer un désordre dans le système de reproduction. Ceci a en particulier été mis en évidence pour les composés "dioxin-like" coplanaires tels que les CB-126 ou CB-77 ainsi que pour les mélanges techniques dans lesquels ils sont abondants, tels que l'Aroclor 1254 ou le Kaneclor 400. Ces composés ou mélanges provoquent des anomalies aux niveaux des ovaires et des testicules chez le médaka (*Oryzias latipes*), le *Micropogonias undulatus*, le tilapia du Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) ou le poisson zèbre (Coimbra et Reis-Henriques, 2005; Khan et Thomas, 2006; Örn et al., 1998).

De nombreuses études sur les effets des PCB et des mélanges industriels (Aroclor) sur les poissons ont été effectuées et ont démontré des modifications des taux d'hormones thyroïdiennes (T4 et T3), et donc une perturbation du système endocrinien, notamment chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), la barbotte brune (*Ameiurus nebulosus*), le médaka (*Oryzias latipes*) et des juvéniles de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Buckman et al., 2007; Schnitzler et al., 2008; Iwanowicz et al., 2009; Brar et al., 2010; Yum et al., 2010).

Des études réalisées sur des juvéniles ou des adultes ont montré que les PCB peuvent également avoir un effet sur la croissance même si les résultats restent contrastés. Ainsi, une exposition à des PCB réduit la croissance chez l'anguille (*Anguilla anguilla*) et chez les larves de *Micropogonias undulatus* (McCarthy et al., 2003; Van Ginneken et al., 2009).

Autres travaux indiquent aussi que des sédiments ou de la nourriture contenant des PCB peuvent affecter le taux de fécondation; c'est le cas chez la sole *Parophrys vetulus* (Casillas et al., 1991), chez les salmonidés (Letcher et al., 2010) et chez le poisson zèbre (Örn et al., 1998).

II.2.5 Approche par les Facteurs d'Equivalence Toxique (TEF)

Les propriétés cumulatives et toxiques des PCB sont étroitement dépendantes de leur structure chimique, c'est-à-dire du nombre et de la position des atomes de chlore des deux cycles benzéniques. Parmi les 209 congénères théoriquement présents dans l'environnement, les 13 PCB ayant une structure similaire aux 2,3,7,8-tétrachlorodibenzodioxine et 2,3,7,8-tétrachlorodibenzofurane font l'objet d'une bioaccumulation intense dans les organismes

vivants où ils subissent une dégradation biologique lente, variable en fonction de la nature du congénère.

Le potentiel toxique de ces congénères peut être exprimé en référence au composé le plus toxique, par l'intermédiaire de facteur d'équivalence toxique (ou de toxicité équivalente à la 2,3,7,8-TCDD) (TEF, Toxic Equivalent Factor). Celui-ci a été développé à partir de 1977 pour évaluer le potentiel toxique d'un mélange de composés chimiquement proches et ayant le même mécanisme d'action, c'est-à-dire actifs sur le même récepteur. Le Tableau I.10 donne les valeurs d'équivalent toxique pour les 13 congénères les plus toxiques.

Le produit « TEF x masse du constituant » permet de calculer pour chaque constituant un équivalent toxique (TEQ). Les équivalents toxiques de tous les constituants du mélange sont ensuite additionnés et définissent en TEQ, la toxicité relative du mélange par comparaison à la dioxine.

Tableau I.10 Facteur d'équivalent toxique de congénères de PCBs (Ahlborg et al., 1994).

	Nom la molécule du PCB	Numéro	TEF
Non orthosubstitués	3,3',4,4'- tétrachlorobiphényle	77	0,0005
	3,3', 4,4',5-Pentachlorobiphényle	126	0,1
	3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphényle	169	0,01
Mono-orthosubstitués	2, 3,3', 4,4'-Pentachlorobiphényles	105	0,0001
	2, 3, 4,4',5-Pentachlorobiphényle	114	0,0005
	2,3', 4,4',5-Pentachlorobiphényle	118	0,0001
	2', 3, 4,4',5-Pentachlorobiphényle	123	0,0001
	2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphényle	156	0,0005
	2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphényle	157	0,0005
	2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphényle	167	0,00001
	2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphényle	189	0,0001
Di-orthosubstitués	2,2',3,3',4,4',5- heptachlorobiphényle	170	0,0001
	2,2',3,4,4',5,5'- heptachlorobiphényle	180	0,00001

II.2.6 Réglementations

La Tunisie a interdit la production et l'utilisation des Polluants Organiques Persistants (dont les PCB) en signant la convention de Stockholm le 23 mai 2001, et l'a ratifiée le 17 Juin 2004. Malgré, l'interdiction d'utilisation des équipements contenant les PCB des quantités importantes de PCB sont encore trouvés. Le bilan général de l'inventaire des déchets et

équipements contenant des PCB a recensé en Tunisie 1190 transformateurs contenant des huiles aux PCB, dont 943 sont encore en service (on-line) et 247 au rebut (Figure I.11) (Convention de Stockholm, 2007).

Au niveau européen, les textes qui ont mené à l'interdiction des PCB sont :

- la convention de Genève 1979 sur la pollution atmosphérique transfrontalière à longue distance, ratifiée entre 34 états membres, mais ne prenant pas encore en compte ce type de pollution;
- la convention d'Århus de 1998 (UNECE, 1998), durant laquelle un protocole à la convention de Genève de 1979 a été ratifié entre les 39 états membres; ce texte interdit la production et l'utilisation de 16 types de POP (dont les PCB) mais n'est entré en vigueur qu'en 2003.

Au niveau mondial, la production de PCB a été définitivement stoppée avec l'arrêt de la production russe en 1993 (AMAP, 2000). Lors de la convention de Stockholm (2001), le retrait de tous les appareils contenant des PCB a été fixé pour 2025 (PNUE, 2010).

Tableau I.11 Inventaire des déchets et équipements contenant des PCB en Tunisie.

	Equipements identifiés		Total	Equipements potentiels	Total général
	S	R	Equipements identifiés		
Nombre transformateurs <i>en unités</i>	943	247	1 190	2 000	3 190
Nombre condensateurs <i>en unités</i>	0	337	337	3 000	3 337
Quantité équipement <i>en tonnes</i>	2547	455	3002	2445	5447 *
Quantité diélectrique <i>en tonnes</i>	658.7	117	776	600	1376

S : en service **R** : au rebut

* dont 5397 tonnes de transformateurs et 50 tonnes de condensateurs

II.3 Les Polybromodiphényles éthers (PBDE)

Les Polybromodiphényles éthers font partie de la famille dite « des retardateurs de flammes ». Cette famille regroupe aujourd'hui une large gamme de produits chimiques aux propriétés ignifugeantes, comme par exemple des produits inorganiques, azotés, organophosphorés et organiques halogénés. Certains de ces produits, largement utilisés dans le milieu industriel, présentent des propriétés similaires aux polluants organiques persistants (persistance, accumulation dans les organismes, toxicité et transport à longues distances) et sont sur le point d'être interdits en Europe. Dès les années 80, ces nouvelles substances,

principalement d'origines anthropiques, attirent l'attention car elles sont retrouvées dans l'environnement loin de leurs sources d'émission (De Wit, 2002; Ikonomou et al., 2002).

II.3.1 Structure chimique et nomenclature

Le terme de PBDE (Figure I.9) désigne une famille de composés organohalogénés de haut poids moléculaire de formule chimique $C_{12}H_{(10-n)}Br_nO$, dans laquelle le nombre d'atomes de brome (n) peut varier entre 1 et 10. La numérotation des atomes de brome est la même que celle des PCB et les congénères sont identifiés selon le même système de numérotation.

Les polybromodiphényles éthers sont produits par bromation des diphenyléthers en présence d'un catalyseur (Sellström, 1996). 209 congénères sont ainsi obtenus. Le nombre d'isomères pour les mono-, di-, tri-, tétra-, penta-, hexa-, hepta-, octa-, nona- et décabromodiphényléther est respectivement de 3, 12, 24, 42, 46, 42, 24, 12, 3 et 1. La classification des PBDEs suit le système IUPAC (voir Tableau I.7) et s'appuie sur le nombre et la position des atomes de brome dans le cycle.

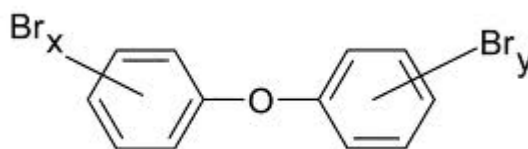


Figure I.9 Structure des PBDE.

II.3.2 Propriétés physico-chimiques

Les PBDE sont des molécules très stables, non hydrolysables. Ils présentent notamment une grande résistance aux acides et aux bases, à la lumière, et aux réactions d'oxydoréduction. Ils possèdent une forte capacité d'adsorption sur les particules. De ce fait, dans le milieu aquatique, les PBDE ont tendance à s'accumuler préférentiellement dans les sédiments et les organismes.

La masse moléculaire des PBDE étudiés varie de 486 g.mol^{-1} pour les composés tétrabromés à 959 g.mol^{-1} pour le décabromé. Leur répartition dans les différents compartiments environnementaux est notamment déterminée par leurs propriétés (Tableau I.12).

Tableau I.12 Principales propriétés physico-chimiques des PBDE les plus rencontrés dans l'environnement (Watanabe et Tatsukawa, 1989; De Wit, 2002; Tittlemier et al., 2002; CEPA, 2006).

Nom	TétraBDE	PentaBDE	HexaBDE	OctaBDE	DécaBDE
N°CAS	40088-47-9	32534-81-9	36483-60-0	32536-52-0	1163-19-5
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	486	565	644	802	959
Densité	—	2,25–2,28	—	2,6	3–3,25
Température de fusion (°C)	79–82	92–98	—	75–220	290–306
Température d'ébullition (°C)	—	décomposition >200	—	Décomposition >232	Décomposition >320
Pression de vapeur saturante à 25°C (°C)	2,6–3,3 10 ⁻⁴	2,9–7,3 10 ⁻⁵	4,2–9,4 10 ⁻⁶	1,2–2,2 10 ⁻⁷	<10 ⁻⁴
Solubilité dans l'eau g.m ⁻³	0,0109	0,0024	0,0010	0,0005	<0,0001
Log K _{ow}	5,9–6,2	6,5–7,0	6,9–7,9	8,4–8,9	10

Kow : coefficient de partition octanol/eau

II.3.3 Sources

Bien que certains de ces composés (dérivés hydroxylés et méthoxylés de PBDE) se trouvent naturellement chez certaines espèces marines (Handayani et al., 1997; Vetter et al., 2002; Malmvärn et al., 2005), l'origine des PBDE est exclusivement anthropique, résultant de procédés industriels.

II.3.3.1 Utilisation

Les PBDE appartiennent à la grande famille des retardateurs de flammes parmi d'autres composés comme les polybromobiphényles (PBB), l'hexabromocyclododécane (HBCD) et les bisphénols bromés. Tous ces produits sont utilisés en tant qu'additifs ignifugeants dans une large gamme de produits industriels ou de consommation courante (Rahman et al., 2001; De Wit, 2002):

- Transport: partie électrique et revêtement textile des avions, bateaux et voitures;
- Construction: polystyrène, polyuréthane, peinture, mastic, éclairages, plastique utilisé pour l'isolation des tuyaux, isolation des toits;
- Industrie: dans divers produits de la chimie, fibres synthétiques, polymères, résines, colles, mousse de polyuréthane pour les meubles et les garnitures intérieures;
- Textiles: textiles de toute sorte, tapis, meubles tels que canapés, matelas,...
- Equipements électroniques: circuits imprimés d'ordinateurs, de télévisions, de chaînes HI-FI, de téléphones, de sèche-cheveux;
- Traitement du bois.

II.3.3.2 Volume produit

Aujourd'hui, la production de ComDecaBDE représente plus de 80% de la demande mondiale (De Wit, 2002). Ceci s'explique par la mise en place d'une réglementation européenne visant à interdire l'utilisation des mélanges les moins bromés (directive 2003/11/CE) à compter du 15 août 2004. A titre d'exemple, le BSEF (Bromine Science Environmental Forum) a estimé la demande commerciale mondiale en retardateur de flammes en 2001 (Tableau I.13). Le mélange technique le plus utilisé au niveau mondial est le ComDecaBDE (56150 tonnes). Les Etats-Unis, suivis de près par l'Asie, sont les plus grands utilisateurs de PBDE, respectivement 33100 et 24650 tonnes de mélanges commerciaux de PBDE (ComPBDE). L'Europe utilise pour sa part 3 fois moins de PBDE que les Etats-Unis soit 8360 tonnes de ComPBDE en 2001.

Tableau I.13 Demande commerciale de PBDE en 2001 (BSEF, 2003).

Mélange industriel	Amériques ¹ (tonnes)	Europe ² (tonnes)	Asie ³ (tonnes)	Autres ⁴ (tonnes)	Total (tonnes)
PentaBDE	7100	150	150	100	7500
OctaBDE	1500	610	1500	180	3790
DecaBDE	24500	7600	23000	1050	56150

¹ Pays d'Amérique du nord, d'Amérique du sud et d'Amérique centrale; ² Pays d'Europe orientale et occidentale; ³ Australie; Nouvelle Zélande et sous continent indien; ⁴ Pays du reste du monde.

II.3.4 Toxicité

Tout comme les PCB, les PBDE peuvent entraîner des effets toxiques sur les organismes, principalement en termes d'exposition chronique.

II.3.4.1 Toxicité aigue

Comme pour les PCB, la toxicité aiguë des PBDE, en particulier des mélanges ComPeBDE, ComOcBDE et ComDeBDE, est faible pour l'homme: les doses létales pour 50 % des individus (DL50) sont supérieures à 1 g/kg de poids corporel (De Boer et al., 2000).

II.3.4.2 Toxicité chronique

En raison de leur similitude chimique avec les dioxines et les PCB, un large et croissant effort de recherche est réalisé concernant les aspects toxiques et la présence de PBDE dans l'environnement. Ce sont des puissants inducteurs des cytochromes P450 (CYP), en

particulier les CYP 1A1 et CYP1A2, mais contrairement aux PCB, les PBDE ne sont pas de forts inducteurs de l'activité « aryl hydrocarbon hydroxylase receptor » (Manchester-Neesvig et al., 2001). Ils ont cependant des conséquences sérieuses sur la santé tels que des effets au niveau des fonctions hépatiques, thyroïdiennes et oestrogéniques, ils sont également susceptibles de générer des perturbations au niveau du développement neuronal et de la fonction de reproduction (De Boer et al., 2000; Darnerud, 2003). Ces substances sont, par ailleurs, reconnues comme étant des perturbateurs endocriniens (De Boer et al., 2000). La perturbation de la fonction de reproduction a également été mise en évidence chez le poisson par Holm et al. (1993), qui constatent une diminution du succès de reproduction après une exposition au Bromkal 70 5DE (mélange technique de tétra BDE, penta BDE et d'hexa BDE). Les PBDE présenteraient aussi des propriétés immunotoxiques, notamment mises en évidence en laboratoire chez la souris (De Wit, 2002).

II.3.5 Réglementations

Les importantes concentrations en PBDE mesurées dans les organismes et les tissus humains, ainsi que les risques toxiques que représentent ces substances pour l'homme, ont amené plusieurs gouvernements et entreprises à limiter l'utilisation et la production de ces produits. Les premières mesures sont appliquées en Europe par la Directive 2002/95/CE du parlement européen. A compter du 1 juillet 2006, les nouveaux équipements électroniques ne doivent plus contenir ni PBB et ni PBDE. L'arrêté du 25/11/05 précise que le décaBDE peut malgré tout toujours être utilisé dans des applications polymérisées. La position du Conseil européen s'est durcie, il a prononcé l'interdiction de la production et de l'emploi, dans toutes les applications du marché européen, des mélanges techniques ComPentaBDE et ComOctaBDE depuis 2004 (directive 2003/11/CE).

II.4 Les Pesticides Organochlorés (OCP)

II.4.1 Généralités

Les OCP sont des composés complexes de synthèse, leurs structures de base sont cycliques ou polycycliques, substitués par un ou plusieurs atomes de chlore. Les OCP sont principalement utilisés dans le domaine de l'agriculture et dans le domaine de la lutte contre les insectes proliférants et vecteurs de maladies (moustiques). Cette famille regroupe de nombreuses molécules regroupées en 5 familles :

- les dichlorodiphenyltrichloroéthanes (DDT et ses dérivés, methoxychlor);
- les hexachlorocyclohexanes (lindane);

- les cyclodiènes (aldrine, dieldrine, endosulfan);
- le toxaphène;
- et les structures telles que le chlordecone et mirex (Blus, 1995).

Les OCP possèdent des demi-vies chez les humains allant de quelques mois à plusieurs années (Thornton, 2000). Ces composés représentent une classe d'agents chimiques avec un fort potentiel de risque pour la santé humaine. Leur persistance et leur caractère lipophile amènent des taux de contamination élevés chez certaines espèces de la chaîne alimentaire aquatique comme les poissons et les mammifères marins (Goerke et al., 2004). Ils se concentrent dans les tissus adipeux des individus et certains d'entre eux perturbent l'activité endocrinienne.

II.4.2 Propriétés physico-chimiques

Les principales caractéristiques physico-chimiques des OCP sont d'abord une grande stabilité (possédant 3 à 9 substitutions par atome de chlore) face aux agents et facteurs de dégradation physico-chimiques et biologiques. Cette stabilité leur confère une certaine persistance dans les milieux naturels où ils sont omniprésents puisque propagés par l'air, l'eau et les espèces migratrices par delà les frontières internationales. Aussi, la semi-volatilité des pesticides organochlorés leur confère un degré de mobilité suffisant leur permettant d'atteindre des concentrations relativement grandes dans l'atmosphère et d'être transportés sur de longues distances, puis se condenser et se déposer dans d'autres régions (Chernyak et al., 1996). Leur statut de substances liposolubles leur confère une aptitude à la bioaccumulation dans les organismes vivants et à être transférés par voie alimentaire dans les chaînes trophiques.

Le Tableau I.14 présente les principales constantes physico-chimiques de quelques OCP.

Tableau I.14 Propriétés physico-chimiques des pesticides organochlorés (ATSDR, 1996, 2002a,b,c; Brignon et Soleille, 2005; Fabre et al., 2005).

Substance	Poids Moléculaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Cste H (Pa.m ³ /mol) ^a	Log K _{ow} ^b	K _{oc} (l/kg) ^c	Facteur de bioaccumulation (BCF)	Dégradation (T 1/2 si disponibles)		
							Photolyse	Hydrolyse	Biodégradation
α-HCH	290,83	1,59–2,0 à 20°C	1,06 à 20°C	3,77	1760–3800	Bivalves : 161 (moules) Poissons : 2400	–	–	–
β -HCH	290,83	0,24–0,32 à 20°C	0,074 à 20°C	3,85	2140–3800	Bivalves : 127 (moules) Poissons : 1520	–	–	–
γ-HCH	290,83	6,8–7,0 à 20°C	0,35	3,69	1350–4800	Invertébrés : 220 (daphnies) Bivalves : 240 (moules) Poissons : 1300	Très faible : 4 % après 80 j	732 j à pH 7 182 j à pH 9	Eaux et sédiments : 16 % après 88 j (aérobie), 97 % après 88 j (anaérobie)
DDT	354,49	0,025 à 25°C	0,84	6,91	1,51.10 ⁵	Invertébrés : 248 Bivalves : 4550–6,9.10 ⁵ (moules) Poissons : 5,1.10 ⁴ –10 ⁵	Très lente : > 150 ans	81 j à pH 9 (formation de DDE)	Eaux : Très faible Sédiments: Significative (formation de DDE et DDD)
DDE	318,03	0,12 à 25°C	2,13	6,51	5,01.10 ⁴	Invertébrés : 41	1 - 6 j	non significatif	Eaux : < DDT
DDD	320,05	0,09 à 25°C	0,41	6,02	1,51.10 ⁵	Invertébrés : 54	Très lente : > 150 ans	non significatif	Eaux : < DDT
Aldrine	364,91	0,011 à 20°C	4,96	6,50	4,68.10 ⁷	Poissons : 3140	significative	–	Eaux : 24 j
Dieldrine	380,91	0,11 à 20°C	0,53	6,20	4,68.10 ⁶	Algues : 7480 Invertébrés : 247–1015 Poissons : 2700–6145	–	–	Eaux : faible
Endrine	380,9	0,2 à 25°C	0,041–0,055	5,34–5,6	3,40.10 ⁴ – 1,57.10 ⁵	Algues : 140–222 Bivalves : 3000 Poissons : 2000–15000	supposée	> 4 ans	Eaux : significative
HCB	284,79	5.10–3 à 25°C	131	5,5	363–3,40.10 ⁴	Algues : 320–24800 Bivalves : 7000 Poissons : 2040–18000	6–70 j	aucune	Eaux : 2,6 ans (aérobie), 10 ans (anaérobie)

^a constante de Henry, ^b K_{OW} : coefficient de partage n-octanol/eau, ^c K_{OC} : coefficient de partage carbone organique/eau.

II.4.3 Classification

Les pesticides organochlorés sont souvent classés selon leurs structures chimiques en deux groupes: les dérivés aromatiques et les dérivés alicycliques.

II.4.3.1 Les dérivés aromatiques

▪ Le DDT et ses métabolites

Le DDT ou le dichlorodiphényl-trichloroéthane fut le premier pesticide à être produit en quantité industrielle et il créa une véritable révolution dans la production agricole. Il a été synthétisé pour la première fois en 1874 et commercialisé à partir de 1945 (U.S. DHHS/PHS/NTP, 2005). Il est facile à synthétiser, peu coûteux et très efficace contre plusieurs espèces d'insectes (Walker, 2000). Ce pesticide organochloré est formé de 2 cycles aromatiques substitués par des atomes de chlore. Il s'agit d'une famille de molécules qui regroupe 2 molécules mères, le 1,1,1-trichloro-2-(2-chlorophényl)-2-(4-chlorophényl)éthane (o,p'-DDT), 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophényl)éthane (p,p'-DDT), et leur 4 métabolites, 1,1-dichloro-2-(2-chlorophényl)-2-(4-chlorophényl)éthane (o,p'-DDD), 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophényl)éthane (p,p'-DDD), 1,1-dichloro-2-(2-chlorophényl)-2-(4-chlorophényl)éthylène (o,p'-DDE) et 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophényl)éthylène (p,p'-DDE). Dans les organismes vivants, le DDT se métabolise en DDE et en DDD. Dans le compartiment sédimentaire le DDT (p,p'-DDT et o,p'-DDT) sous conditions anaérobies peut être déhydrochloré par des microorganismes en DDD (p,p'-DDD et o,p'-DDT) lequel peuvent être dégradé en quelques produits mineurs. En milieu aérobie le DDT est dégradé par déhydrochlorination en DDE (p,p'-DDE et o,p'-DDE) et en DBP (p,p'-dichlorobenzophenone) par oxydation (Pereira et al., 1996). La vitesse de dégradation dépend de plusieurs facteurs, notamment le type de sédiment, la température et la teneur en carbone organique. Le rapport DDE/DDT est couramment utilisé pour indiquer si les apports sont récents ou anciens. Un rapport DDE/DDT supérieur à 3 indique un apport ancien (De Mora et al., 2004; Stranberg et al., 1998). Plus de détails sur l'utilisation de ce rapport sont donnés dans le chapitre II et IV.

▪ L'hexachlorobenzène (HCB)

Le HCB est un fongicide qui a été utilisé depuis 1945. Ce composé est également un sous produit de la fabrication de produits chimiques industriels comme le tétrachlorure de carbone, le trichloroéthylène et le pentachlorobenzène. Il est présent sous forme d'impuretés dans

plusieurs formulations de pesticides et de chlorophénols. Il est fortement persistant dans le milieu ambiant en raison de sa stabilité dans des environnements acides et alcalins et de sa résistance à la biodégradation. Il possède un fort potentiel de bioaccumulation.

II.4.3.2 Les dérivés alicycliques

Les composés de ce groupe se subdivisent en deux sous groupes: les dérivés du cyclopentadiène et les dérivés cyclaniques.

II.4.3.2.1 Les dérivés du cyclopentadiène

Les dérivés de ce groupe sont obtenus à partir du cyclopentadiène par réaction de Diels-Alder.

▪ Heptachlore

L'heptachlore est un insecticide, agissant par ingestion et contact. Il a été utilisé intensivement pour le traitement de graines et des sols afin de protéger le maïs, les petites céréales, et le sorgho contre des parasites pour contrôler les fourmis, les larves, les termites et les charançons. Il a également été employé pour un usage domestique (lutte contre les termites). Son métabolite principal est l'heptachlore époxyde obtenu par l'oxydation de l'heptachlore. Des effets cancérogènes de l'heptachlore ont été démontrés chez l'animal, ce qui a également entraîné son interdiction en 1972.

▪ Aldrine et dieldrine

L'aldrine ou 1,2,3,4,10,10-hexachloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-1,4-endo,exo-5,8-diméthano-naphthalène est un insecticide du sol très efficace. Il est métabolisé rapidement par les végétaux et les animaux en dieldrine qui dérive de l'aldrine et dont elle diffère par la présence d'un cycle époxyde. Il est donc rare de trouver des résidus d'aldrine dans les aliments et les animaux et, le cas échéant, les concentrations mesurées sont faibles. Dans l'hémisphère sud l'aldrine et le dieldrine sont encore employés dans la culture du tabac, du coton et dans la production du citron.

Des niveaux élevés de dieldrine ont été mesurés dans le placenta, les tissus mammaires et la moelle osseuse de femmes (Scheele, 1998). Il est un des plus persistants parmi les produits chimiques connus (Jorgenson, 2001).

▪ Le Chlordane

Le chlordane est un insecticide qui a été utilisé intensivement en Amérique du Nord entre 1950 et 1970 pour traiter les cultures, les gazons, les jardins et comme agent protecteur pour le bois. La fabrication de chlordane engendre des produits secondaires qui sont l'oxychlordane et les trans- et cis-nonachlor (AMAP, 1998). On en retrouve encore dans les aliments, le sol, l'air et les précipitations (Mattina et al., 2000; Eitzer et al., 2003; Offenberg et al., 2004; Sun et al., 2006; Hoekstra et al., 2003). Les énantiomères sont bioamplifiés différemment dans la chaîne alimentaire (De Geus, 1999). Le chlordane est susceptible de se bioaccumuler et produit des effets par le biais de la chaîne alimentaire. Il est nocif sur les organismes terrestres et aquatiques. Le chlordane a été classé par l'Union Européenne comme substance cancérigène de catégorie 3.

II.4.3.2.2 Les dérivés cyclaniques

- **Hexachlorocyclohexane (HCH)**

Le HCH est un insecticide très actif, qui a été utilisé contre un vaste éventail d'insectes terrestres et phytophages. Il a été synthétisé depuis 1826 par Michaël Faraday (Picot, 1983). Cette synthèse se fait par addition du chlore radicalaire sur le benzène (UV, peroxydes, irradiation avec une source radioactive au ^{60}Co). Il présente 16 isomères stéréochimiques possibles dont 7 sont présents dans le HCH technique. Seul l'isomère γ de l'hexachlorocyclohexane nommé lindane possède une activité insecticide (Whaley et al., 2001), les autres isomères sont utilisés comme fongicide ou pour la synthèse d'autres composés.

- **Le mirex**

Le mirex a été employé principalement pour contrer les fourmis dans le sud-est des États-Unis, pour combattre les chenilles en Amérique du Sud et les termites en Afrique du Sud. Le mirex a également été employé industriellement comme agent ignifuge dans les plastiques, le caoutchouc, la peinture, le papier et les composants électriques (Fisher, 1999). Ce composé a été mesuré dans les poissons des Grands Lacs et il est bioamplifié dans la chaîne alimentaire (Hickey et al., 2006). Le mirex a été banni dans beaucoup de pays (Hickey et al., 2006). Peu d'études ont été conduites pour connaître ses effets à long terme ou ses effets à faibles doses mais il est considéré comme un cancérigène potentiel (AMAP, 1998).

II.4.4 Toxicité des OCP

L'homme et les animaux en général, absorbent les pesticides et leurs produits dérivés via la nourriture, l'eau, par contact avec la peau et les cuticules, ou encore par inhalation. Une étude conduite aux Etats Unis a mis en évidence la présence de résidus de pesticides dans différentes matrices tels que l'urine, le sang, les tissus adipeux et même le lait maternel (www.observatoire-pesticides.gouv.fr).

La plupart des pesticides organochlorés, dont le lindane, sont des stimulants du système nerveux central. Ils agissent en réduisant le transport du potassium à travers les membranes, en altérant le flux de sodium, en inhibant la pompe Na^+ , K^+ -ATPase et la pompe Ca^{2+} -ATPase. La toxicité des organochlorés est déterminée par de nombreux facteurs tels que l'âge, le sexe, le type d'exposition, la formulation, l'interaction avec d'autres polluants...

II.4.4.1 Les intoxications aiguës

Les intoxications aiguës des pesticides organochlorés ont été observées chez l'animal au cours de l'expérience au laboratoire et chez l'homme lors des accidents ou des suicides. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que chaque année dans le monde il ya un million de graves empoisonnements, avec quelque 220 000 décès (WHO, 1994).

La toxicité aiguë d'un pesticide s'exprime par son DL50 ou CL50 (dose létale ou concentration létale d'un produit nécessaire pour tuer 50% de la population exposée). Cette valeur varie selon la nature du pesticide, la voie de pénétration ainsi que l'espèce concernée. Plus la DL50 ou CL50 est faible plus le composé est toxique (Tableau I.15).

Tableau I.15 Dose létale de quelques OCP (Bouguerra, 1985).

Insecticides	Dose létale 50 (mg Kg^{-1})	
	Rat femelle (Voie orale)	Mouche domestique (Voie cutanée)
DDT	118	2
Aldrine	60	2,25
Dieldrine	46	1,95
Heptachlore	162	2,25
Lindane	91	0,85
Méthoxychlore	6000	9
Endrine	7,5	3,15
Dihydroheptachlore	5000	3,75
Toxaphène	80	11

II.4.4.2 Les intoxications chroniques

Les OCP ont une toxicité aiguë faible mais ils présentent une toxicité chronique élevée car ils sont très stables et bioaccumulables. Chez l'homme les intoxications chroniques s'observent surtout dans le milieu professionnel des fabricants et des utilisateurs des pesticides suite à l'absorption quotidienne et continue de faible dose pendant un temps plus ou moins long. En plus certains aliments d'origine animale ou végétale couramment consommés par l'homme contiennent des résidus de pesticides.

Les principaux signes d'intoxications chroniques incluent atteintes dermatologiques, perturbations hormonales, atteintes neurologiques, troubles du système immunitaire, atteintes du système respiratoire, atteintes des fonctions sexuelles, risques fœtaux, maladies neurodégénératives, cancers et hémopathies malignes (Narahashi, 1992; Schuurman et al., 1992; Karmaus et al., 1995; Toppari et al., 1996; Van Leeuwen et al., 1999; Alavanja et al., 2004; Lemaire et al., 2004; Laville et al., 2006; Provost et al., 2007; Weisskopf et al., 2010).

II.4.5 Réglementations

L'intérêt public concernant les résidus de pesticides dans les produits de consommation n'a cessé d'augmenter ces vingt-cinq dernières années (Haib et al., 2003) et a conduit les autorités législatives à mettre en place des réglementations strictes ainsi que des suivis de la qualité des produits de consommation. Ces actions sont menées dans le but d'éviter les risques pour le consommateur mais aussi pour réguler le marché international (Garrido et al., 2004; Nunez et al., 2005).

Depuis le début des années 80, l'Union européenne a progressivement encadré l'utilisation des pesticides par diverses réglementations visant à réduire les impacts avérés pour l'environnement et les risques plausibles pour la santé humaine. La directive 91/414/CE adoptée en 1991, par le conseil européen, vise à évaluer les risques pour la santé et l'environnement des pesticides utilisés en agriculture afin d'optimiser la protection de l'homme et des milieux (UE, 2001). Parmi les exemples les plus marquants, on peut citer le retrait en 1998 du lindane utilisé en traitement de sol contre les ravageurs souterrains, et récemment le retrait des triazines, herbicides les plus utilisés, en raison de la présence de résidus dans les eaux souterraines et superficielles, supérieures aux normes européennes.

En Tunisie durant les années 1940 et 1980, l'utilisation du DDT était très répandue mais il a été interdit au début de 1984. En 2001, le gouvernement Tunisien a signé le protocole de la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants qui a interdit l'utilisation de l'aldrine, le chlordane, la dieldrine, l'endrin, l'heptachlore, l'hexachlorobenzène (HCB), le

mirex et le toxaphène (APEK, 2005). Malheureusement, les restrictions et l'interdiction sur l'utilisation de certains pesticides ne sont pas vraiment applicables en Tunisie à cause des mauvaises conditions de stockages de ces produits et l'absence d'inspections régulières. Récemment le Ministère de l'Environnement et du Développement Durable (MEDD), avec la participation de la Direction Générale de la Protection et du Contrôle de la Qualité des Produits Agricoles (DGPCQPA) relevant du Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, a procédé à l'inventaire préliminaire des pesticides obsolètes. Cet inventaire a regroupé l'ensemble des pesticides périmés déclarés jusqu'à la date du 18 janvier 2003. Une actualisation sommaire de cet inventaire national préliminaire a été effectuée en mars 2004. La quantité de pesticides périmés du type Polluants Organiques Persistants, est d'environ 43 tonnes, comprenant 1 676 litres de pesticides liquides et 41 210 kg de pesticides solides. L'inventaire préliminaire donne des informations précises sur la situation de ces stocks, mais certaines données doivent être d'avantage détaillées, Le nombre de sites identifiés, à la date de l'inventaire (mars 2004) s'élève à 128 sites. L'état des emballages de ces pesticides, bien que variable, d'un site à l'autre, et d'un produit à un autre, peut présenter des risques de déversement et de contamination des lieux (Convention de Stockholm, 2007).

II.5 Les éléments Traces Métalliques

II.5.1 Sources

Les éléments traces métalliques ou métaux sont des composants naturels de l'écorce terrestre, présents principalement sous forme de minerais. Ils sont donc présents naturellement dans le compartiment continental (sols, eaux), dans le compartiment marin (eaux et sédiments), dans l'atmosphère et dans la biosphère. D'autres phénomènes, tels que le volcanisme, les feux de biomasse et les sources thermales, contribuent au rejet de métaux dans l'environnement (Rocher, 2003). A ces apports naturels se sont ajoutés les métaux émis à la suite des activités anthropiques: exploitation des gisements et utilisation des métaux dans de nombreux secteurs d'activité (métallurgie, fonderie, incinération des déchets, combustion des matériaux fossiles et des carburants, épandage de produits phytosanitaires et de fertilisants en agriculture).

Actuellement, Les métaux les plus contrôlés sont ceux les plus utilisés par les industries: l'Arsenic (As), l'Aluminium (Al), le Cadmium (Cd), le Chrome (Cr), le Cobalt (Co), le Cuivre (Cu), le Fer (Fe), le Mercure (Hg), le Nickel (Ni), le Plomb (Pb), l'Etain (Sn), l'Argent (Ag) et le Zinc (Zn).

Les différentes activités industrielles responsables de ces apports de métaux lourds à l'environnement peuvent être classées comme suit:

- Laboratoire photographique: apport en Cd surtout;
- Tannerie: apport en Cr;
- Textile: apport en Cr;
- Produits pharmaceutiques: Zn, Cu, Ni, Cr, Cd, Pb, (surtout Cr et Cu);
- Teintures et pigments: Zn, Cu, Ni, Cr, Cd, Pb (surtout Zn, Cu, Ni, Pb);
- Peinture: Zn, Cr, Pb;
- Fabrication de batterie: Pb;
- Gravure, impression: Zn, Cr, Pb (surtout);
- Fabrication de métaux: Zn, Cu, Ni, Cr (surtout Zn et Cr);
- Travail du Cuivre, Zinc et autre alliage: Zn, Cu, Ag, Ni, Cr;
- Equipement de véhicules: Zn, Cu, Ni, Cr, Cd, Pb;
- Electronique: Cu, Ni, Ag, Pb (surtout Cu);
- Traitement de surface: Zn, Cu, Ni, Cr, Cd (surtout Zn, Cr, Ni);
- Acier et Sidérurgie: Zn, Cu, Ni, Cr, Cd, Pb;
- Raffinage des métaux non ferreux: Zn, Cu, Pb.

II.5.2 Caractéristiques physico-chimiques

En milieu aquatique, les métaux sont présents sous forme dissoute, complexés à la matière organique dissoute ou adsorbés sur les particules (Essid, 2008). Les métaux présents dans les écosystèmes peuvent être des métaux lourds ou des métaux traces. Les premiers désignent tous les métaux de forte masse atomique comme le plomb, le chrome, le cadmium, l'arsenic ou le mercure. Les métaux traces existent dans l'environnement à faibles concentrations; certains d'entre eux sont des oligoéléments biogènes souvent doués de propriétés hormétiques alors que d'autres, moins intéressants pour les êtres vivants, sont souvent très toxiques comme le cobalt.

Les métaux présentent un polymorphisme chimique dépendant à la fois de leur forme spécifique et du composé, minéral ou organique, dans lequel ils sont incorporés. La forme physico-chimique d'un métal (spéciation) conditionne sa mobilité et par suite sa biodisponibilité. En général, la forme libre ou ionique, la plus biodisponible, est la plus toxique.

Les métaux pris en considération dans le présent travail sont le zinc (Zn), le cuivre (Cu), l'argent (Ag), le cadmium (Cd), le nickel (Ni), le plomb (Pb), l'arsenic (As) et le Cobalt (Co). Ces métaux sont fréquemment utilisés dans la littérature *in vitro* (ou en microcosmes) pour étayer les conditions de biodisponibilité et de toxicité (Zarcinas et Rogers, 2002; Al Khateeb

et Al-Qwasemeh, 2013). Nous présenterons ci-après, les caractéristiques des métaux sélectionnés pour notre étude:

- **Le Zinc (Zn):** C'est un métal simple et biogène doué de propriétés hormétiques. Il est rencontré habituellement en association avec le plomb, le cuivre, l'or et l'argent et il se présente sous forme de sphalérite (sulfure), smithsonite (carbonate), calamine (silicate), et franklinite (zinc, manganèse, oxyde de fer). Le Zn possède 2 états de valence (+I, +II), mais n'est présent dans les eaux naturelles que sous sa forme divalente. Le zinc est facilement adsorbé par les minéraux argileux, les carbonates ou hydroxydes. Tessier et al. (1996) ont montré que la plus grande proportion de zinc dans des sols et sédiments contaminés était associée aux oxydes de fer et de manganèse.
- **Le cuivre (Cu):** Ce corps simple est aussi un métal biogène qui intervient dans la constitution du groupement prosthétique de divers enzymes animaux ou végétaux. Dans la nature, on le trouve surtout sous forme de sulfures cuivreux (valence +I) ou cuivrique (valence +II), d'oxydes de cuivre (CuO) ou de carbonates basiques (malchite, azurite). Le cuivre est généralement biodisponible pour les organismes sous le degré d'oxydation (I) ou (II), à partir de sels inorganiques ou de complexes organiques. Il se trouve dans les roches basaltiques, les schistes et à moindre mesure dans le granit. Dans les sols, 98% du cuivre se trouve sous forme complexée à la matière organique.
- **L'argent (Ag):** C'est un métal relativement ductile et très malléable, apprécié pour son éclat blanc particulier. Dans la nature, on le trouve surtout sous forme d'Ag₂S. Il est très toxique pour les bactéries, les champignons et de nombreux organismes à sang froid.
- **Le cadmium (Cd):** Il fait partie des éléments en traces métalliques dits non essentiels (Turkmen et al., 2005; Miquel, 2001). Sa demi-vie biologique peut aller de 10 à 30 ans (Nriagu et Pacyna, 1988). Le cadmium est un élément rencontré en milieu aquatique sous diverses formes physiques (dissoutes, colloïdales, particulières) et chimiques (minérales ou organiques). Un ensemble de variables physicochimiques du milieu (salinité, pH, potentiel redox, caractéristiques sédimentologiques, nature géochimique des particules, concentration en chlorures) gouvernent les transformations du cadmium dans l'environnement (Gonzalez et al., 1999; Chiffolleau et al., 2001).

Les formes dissoutes (< 1 nm) de cet élément en milieu aquatique sont des espèces libres (Cd^{2+}) et formées par des associations (complexation) de cadmium avec des composés (ligands ou complexant) minéraux ou organiques.

Les formes colloïdales (de 450 à 1 nm) peuvent se fixer à des oxydes de Fer, de Manganèse, des hydroxydes, des carbonates, des argiles ou de la matière organique colloïdale.

Les formes particulières ($> 0,45$ μm) se font par intégration du Cadmium dans la structure cristalline de minéraux détritiques (bruit de fond géochimique), par liaison à une fraction d'origine organique (carbonates, restes d'organismes, pelotes fécales), par précipitation avec différentes fractions minérales (carbonates, phosphates, oxydes et hydroxydes de Fer ou de Manganèse, sulfures) et par adsorption sur des phases de différentes natures (argiles, matière organique, oxydes et hydroxydes de Fer et de Manganèse) (Gonzalez et al., 1999).

- **Le nickel (Ni):** Ce métal de couleur blanche, est brillant et inoxydable sous sa forme simple. Le nickel est souvent associé au Fe, Cu, Cr et Co dans les minerais de zinc. On le retrouve particulièrement dans les minerais sulfurés (65% de la production mondiale) extrait des sous-sols (teneur en nickel de 0,7% à 3%) et dans les minéraux silicatés se trouvant en surface. Dans le milieu aqueux, le nickel existe seulement au degré d'oxydation divalent Ni(II). La solubilité des minerais de nickel est considérablement moins élevée que celle d'autres métaux (Dang, 2011).
- **Le plomb (Pb):** Fait partie des ETM (Eléments en Traces Métalliques) non essentiels (Miquel, 2001; Turkmen et al., 2005). Le corps simple de ce métal est gris bleuâtre, mou et flexible et de densité 11. Le plomb est très souvent associé au zinc dans les minerais mais aussi à de nombreux autres éléments (Fe, Cu, Cd, As...) qui sont en grande partie récupérés lors des opérations métallurgiques. Le principal minerai de plomb est la galène (PbS), très souvent associée à la blende (ZnS) et à la pyrite (FeS_2). Il est généralement considéré comme étant fortement retenu dans les sols et donc peu mobile, en particulier en conditions réductrices (Dang, 2011).
- **L'arsenic (As):** C'est un métalloïde, chalcophile (i.e. forte affinité pour le soufre) et analogue chimique du phosphore. Dans les eaux et dans les sols, l'arsenic existe sous plusieurs formes et à différents degrés d'oxydation (0, III et V). La distribution entre les formes d'As(III) et d'As(V) est fortement dépendante du potentiel d'oxydo-réduction, respectivement en milieu réducteur et oxydant. L'arsenic est souvent associé sous forme de complexes organo-métalliques.

- **Le Cobalt (Co):** Il est présent souvent associé au nickel, à l'argent, au plomb et au cuivre. Les minerais sulfurés ou sulfuro-arsénics représentent les sources principales de cobalt dans l'environnement (Pichard et al., 2006). Dans des sols et des sédiments, le cobalt est fortement et rapidement adsorbé sur les oxydes de fer et de manganèse ainsi que sur les argiles et la matière organique (Dang, 2011).

II.5.3 Toxicité

Il convient de distinguer deux groupes de métaux: ceux qui sont nécessaires aux espèces vivantes et ceux qui ne le sont pas:

- les métaux qui ont un rôle physiologique chez les organismes vivants ne sont pas considérés comme toxiques pour les organismes sauf si leurs concentrations sont anormalement élevées. Ces métaux essentiels entrent dans la constitution d'enzymes, de pigments respiratoires, interviennent dans les échanges cellulaires. Ce sont le Cu, le Fe, le Zn, le Mg, le Mn. Ils sont nécessaires à la vie. Ce sont des oligo-éléments.

- les métaux qui n'entrent pas dans la composition des êtres vivants et n'ont donc pas de rôle biologique, sont toxiques pour les êtres vivants s'ils atteignent des sites métaboliques actifs et s'y accumulent. Ces métaux lourds sont au nombre de 38 (Hg, Cd, Pd...). Leur densité est supérieure à 5.

Les métaux peuvent être dangereux pour la santé de l'ensemble des populations, en particulier des organismes aquatiques du fait de leur présence dans l'eau au-delà d'un certain seuil de tolérance (à titre d'exemple la catastrophe de Minamata au Japon, en 1953, liée à une pollution des eaux par le mercure, mais également l'important développement de la maladie Itai-Itai au Japon, dans les années 60, en raison d'une contamination des eaux de boisson et du riz par le cadmium). Les effets toxiques des métaux ainsi que leur comportement au sein du milieu aquatique (mobilité, biodisponibilité) vont dépendre en grande partie de leur spéciation, qui correspond à la répartition de cet élément en ses différentes espèces, formes ou phases (solubles et / ou insolubles) (Boust et al., 1999), de l'organisme considéré (espèce, sexe, âge et stade de développement) et de la concentration dans un organe déterminé (Calow, 1994; Rand et al., 1995; Amiard-Triquet et Rainbow, 2009).

La présence des métaux dans les eaux et les sédiments peut se traduire chez les organismes aquatiques par l'apparition de formes anormales (nécrose, ulcération, atrophie), par l'altération des membranes cellulaires, par des perturbations du métabolisme, de la photosynthèse et de la réparation de l'ADN (Calow, 1994). L'arsenic, le cobalt, le cadmium, le chrome et le nickel présentent également des propriétés mutagènes ou cancérogènes

(Hartwig, 1998; Chen et White, 2004). Yamaguchi et al. (2007) ont également montré dans leurs études les effets négatifs du plomb, de l'arsenic, sur la spermatogenèse du poisson. Des modifications comportementales peuvent également apparaître chez certaines espèces de poissons (Scott et Sloman, 2004). A des concentrations relativement faibles dans les eaux (quelques ppm), le zinc devient toxique (Ramade et Papigny, 2000). Il est capable d'inhiber la photosynthèse du phytoplancton et des algues macrophytes. Ce métal est capable également de causer des lésions tissulaires, notamment chez les invertébrés aquatiques et chez les poissons, responsable d'un retard de la croissance et d'une perturbation de la reproduction (Ramade et Papigny, 2000). Le cuivre présente une toxicité élevée pour les organismes aquatiques à des concentrations relativement faibles, en particulier pour les algues, ce qui explique l'usage de certains sels de cuivre comme algicides (Ramade et Papigny, 2000). Des études récentes dans la lagune de Bizerte ont montrés également l'effet toxique des métaux sur les nématodes libres (Beyrem et al., 2007; Hedfi et al., 2007; Mahmoudi et al., 2007a,b; Hedfi et al., 2008).

Les contaminants métalliques sont disponibles pour les organismes aquatiques via l'ingestion de nourriture (accumulation le long de la chaîne alimentaire et fraction associée aux matières en suspension et aux sédiments), via la respiration et via le transport à travers les membranes biologiques (Eggleton et Thomas, 2004).

II.5.4 Spéciation et biodisponibilité

Les éléments métalliques peuvent être présents sous formes dissoute ou particulaire dans le milieu aquatique. Dans ce dernier, on peut rencontrer plusieurs entités. Parmi ces entités, on retrouve généralement un mélange de cations, d'anions et de molécules inorganiques (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , PO_4^{3-} , Si(OH)_4 ...), et de matières organiques dissoutes (urée, acides amines, acides humiques et fulviques). Il faut ajouter à cela les colloïdes et les particules en suspension issus des sols et des sédiments ainsi que des particules d'origine biologique (phytoplancton et zooplancton notamment). Ces entités sont caractérisées par des surfaces d'échange variables. Ainsi, selon les constantes cinétiques et thermodynamiques réactionnelles, les métaux peuvent être présents en tant qu'ions libres hydratés, complexés par des ligands organiques et/ou inorganiques, adsorbés sur des colloïdes ou des MES, (co)précipités (figure I.10)... La répartition d'un métal selon ces différentes formes est communément appelée spéciation (Stumm et Morgan, 1996). Ce sont ces différentes associations qui conditionnent le comportement, la biodisponibilité et la toxicité des métaux vis-à-vis des organismes aquatiques.

La mobilité des métaux se traduit généralement par le passage de la forme colloïdale et particulaire à la forme dissoute. Le pH, l'oxygène, la salinité, la dureté et la teneur en carbone organique sont les paramètres physico-chimiques qui influencent en majeure partie ce type d'échange dans l'eau (Burgess et Scott, 1992). Par exemple, lors d'une diminution du pH dans l'eau, la concentration des métaux sous forme ionique augmente du fait de la compétition avec un nombre croissant d'ions hydronium vis-à-vis des sites d'adsorption. Ainsi la mobilité des métaux augmente généralement dans le milieu lorsque le pH diminue.

La matière organique joue également un rôle très important vis-à-vis de la mobilité et de la biodisponibilité des métaux. Sa présence (dissoute ou particulaire) engendre beaucoup de réactions de complexation. Les concentrations en métal libre (considérées comme étant les plus assimilables par les organismes aquatiques) diminuent alors, entraînant par la même occasion une diminution de la biodisponibilité métallique (Fairbrother et al., 2007).

Afin de pouvoir relier le niveau de contamination des différents compartiments de l'environnement aquatique au risque que représente cette pollution vis-à-vis des organismes qui y vivent, il est indispensable de connaître la fraction biodisponible de chaque contaminant. La biodisponibilité d'une substance peut être définie comme la fraction de la charge totale du produit présent dans le sédiment et l'eau (dont l'eau interstitielle) qui peut être transférées aux tissus de l'organisme, à l'exception du tractus digestif (qui est considéré comme faisant partie du milieu extérieur; Belfroid et al., 1996). L'exposition des organismes aquatiques peut avoir lieu directement par l'intermédiaire de la colonne d'eau ou de l'eau interstitielle au niveau des voies respiratoires et du tégument, mais également par la nourriture contaminée au niveau du système digestif ou par le biais des particules de sédiment notamment lors de l'ingestion de celles-ci (Belfroid et al., 1996). Par conséquent, la biodisponibilité des métaux dépend non seulement de leur distribution (et de leur spéciation) entre les différents compartiments mais également de la physiologie et de l'écologie de l'organisme lui-même.

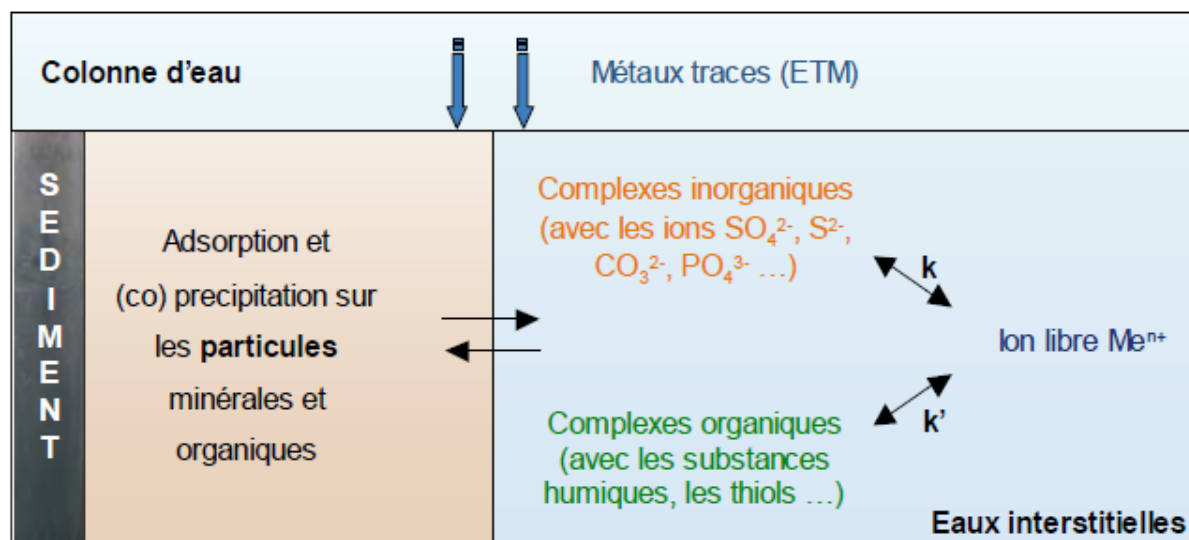


Figure I.10 Spéciation des éléments traces métalliques dans les particules sédimentaires et les eaux interstitielles (k et k' représentent les constantes d'équilibre entre les formes libre et complexée d'un élément) (Charriau, 2009).

II.6 Distribution et devenir des polluants (HAP, PCB, PBDE, POC et métaux) dans les écosystèmes

Une fois introduits dans le milieu naturel, les HAP, les PCB, les PBDE, les POC et les métaux vont se retrouver disséminés dans les différents compartiments de l'environnement. Les modes de dissémination sont majoritairement conditionnés par leurs propriétés physicochimiques (solubilité, K_{ow} , K_{oc} (coefficient de sorption au carbone organique), temps de demi-vie...) ainsi que des caractéristiques pédo-climatiques et topographiques du territoire (structure, texture du sol, MO, biodiversité, microorganismes...). Les principaux processus régissant le devenir des polluants organiques persistants dans l'environnement sont l'adsorption sur les matières particulaires, la biodégradation, la photodégradation et la volatilisation. Souvent ces processus sont accompagnés par de l'oxydation et/ou de l'hydrolyse. Ces transformations peuvent se produire dans quelques jours à quelques mois.

Le transfert de ces composés est essentiellement dû au lessivage des sols et des eaux de ruissellement qui drainent vers les zones aquatiques des quantités importantes de produits et de résidus. Les contaminants peuvent alors s'adsorber sur des particules minérales (perte de biodisponibilité, piégeage dans les sédiments). Ils sont capables également de circuler dans les eaux pendant un temps plus ou moins long (substances plus ou moins rémanentes). Durant leur voyage jusqu'à la mer, ils sont susceptibles d'entrer en contact avec des organismes, soit par adsorption soit par absorption. Les contaminants peuvent également être transportés sur

des longues distances en passant par les courants atmosphériques (Wolff et Peel, 1994). (Figure I.11).

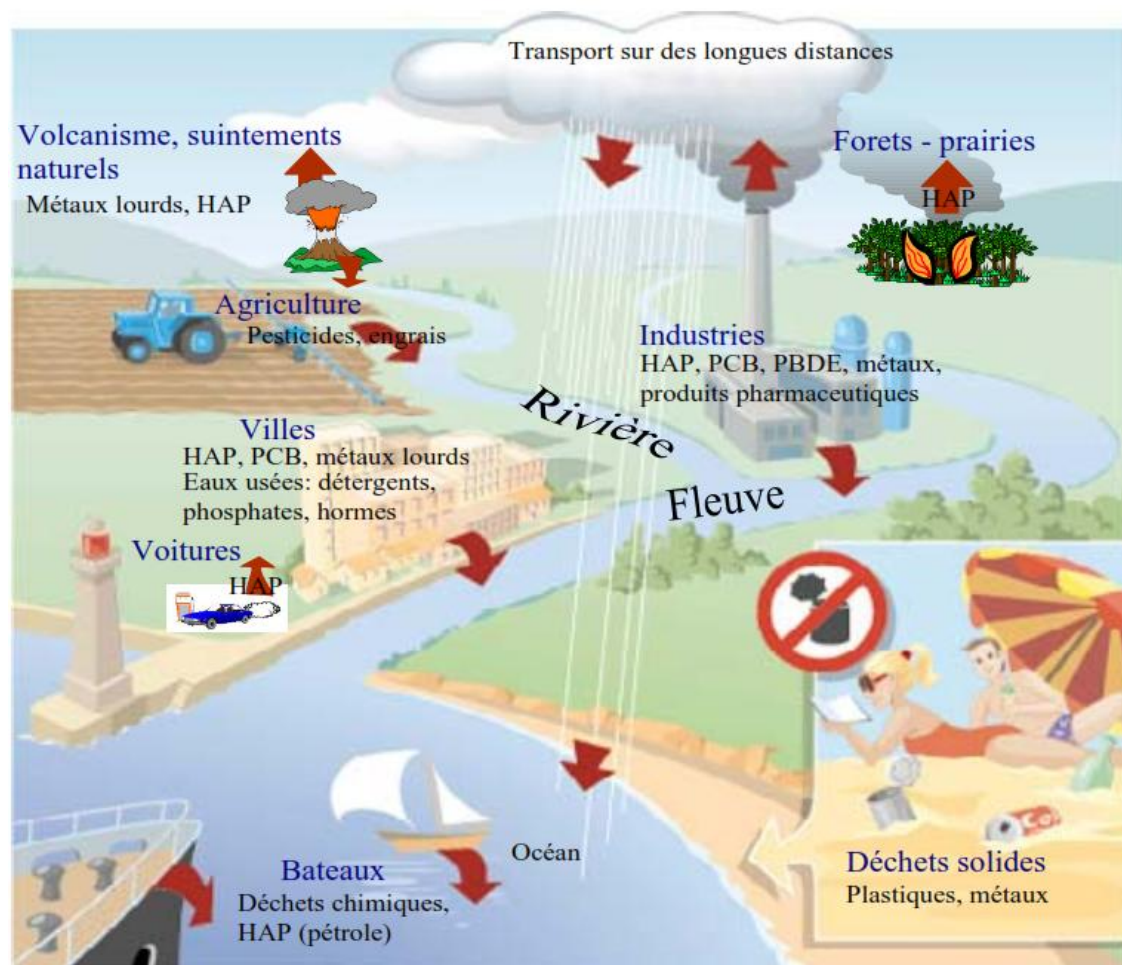


Figure I.11 Sources de pollution dans l'environnement (modifié Champeau, 2005).

Du fait de leurs propriétés physico-chimiques, les HAP sont émis dans l'atmosphère compartiment à partir duquel ils peuvent ensuite se disperser dans les autres compartiments de l'environnement (Figure I.12). Durant leur temps du séjour dans l'atmosphère, les HAP coexistent à la fois en phase gazeuse et en phase particulaire. La propriété physico-chimique déterminante quant à leur appartenance à l'une ou l'autre des deux phases est la pression de vapeur saturante. Ainsi, les composés aromatiques les plus légers, dont les pressions de vapeur saturante sont élevées, sont majoritairement présents dans l'atmosphère sous forme gazeuse. Les HAP les plus lourds, possédant des pressions de vapeur saturante plus faibles sont d'avantage associés à la phase particulaire. Dans le milieu marin les HAP ont tendance à s'associer à la matière organique dissoute ou à s'adsorber sur les matières en suspension présentes dans l'eau (Knezovich et al., 1987; Landrum et Robbins, 1990) et à sédimenter. Ils peuvent également se concentrer dans le film hydrophobe présent à la surface de l'eau

(Cincinelli et al., 2001). Lors de leur sédimentation, les HAP peuvent également être photo-oxydés dans la zone photique (Zepp et Schlotzhauer, 1979; Miller et Miller, 1981) ou bien être biodégradés par des bactéries (Narro et al., 1992; Sutherland et al., 1995; Grishchenkov et al., 2000). La sédimentation aboutit à l'incorporation des HAP dans les sédiments qui constituent un compartiment de stockage important des contaminants hydrophobes (McElroy, 1989; James et Kleinow, 1994).

Cependant, outre leurs propriétés physico-chimiques, la distribution des HAP dans l'environnement marin dépend également des caractéristiques du milieu. Ainsi, l'affinité des HAP pour les particules en suspension ou les sédiments peut varier en fonction de différents paramètres liés au milieu (Landrum et al., 1992; Harkey et al., 1994). La teneur en carbone organique, la granulométrie, le temps de contact avec le polluant (Harkey et al., 1994) et l'âge de la matrice sont des paramètres déterminants. Ainsi, Knezovich et al. (1987) ont observé que plus les particules sont riches en carbone organique, plus l'affinité des HAP pour ces particules est forte. De plus, Gobas et Zhang (1994) ont montré que la part des HAP les moins solubles présents sous forme dissoute dépend de la teneur en particules organiques de la colonne d'eau alors que la teneur en matière organique dissoute ne semble pas influencer. Les particules de faible granulométrie présentent également une surface d'adsorption plus élevée que les particules de plus forte granulométrie. Harkey et al. (1995) ont constaté que la biodisponibilité des HAP dans une carotte sédimentaire diminue avec la profondeur, illustrant ainsi le fait que plus le sédiment est âgé, plus les interactions « contaminant-matrice » sont fortes. Cependant, ce phénomène ne se vérifie pas pour le sédiment de surface. Les auteurs font l'hypothèse d'une plus forte concentration de macromolécules avec des groupes fonctionnels contenant un atome d'oxygène à l'interface avec l'eau pour expliquer cette différence de biodisponibilité.

Au cours de ces cycles géochimiques, les HAP peuvent être ingérés par les organismes marins. La disponibilité des HAP pour ces organismes dépend de leur état dans le milieu. Ainsi, les HAP dissous sont plus biodisponibles que les HAP adsorbés (Neff, 1985). Du fait de leur hydrophobicité et de leur poids moléculaire relativement faible, une fois absorbés, les HAP peuvent être transférés et piégés dans les organes riches en lipides des organismes par diffusion passive à travers les membranes.

Les PCB sont présents dans tous les compartiments de la biosphère, et une grande partie des êtres vivants y sont exposés (Safe, 1993; Van den Berg et al., 2006). Cependant, le milieu aquatique en général et marin en particulier, (Figure I.13) est beaucoup plus contaminé que les autres.

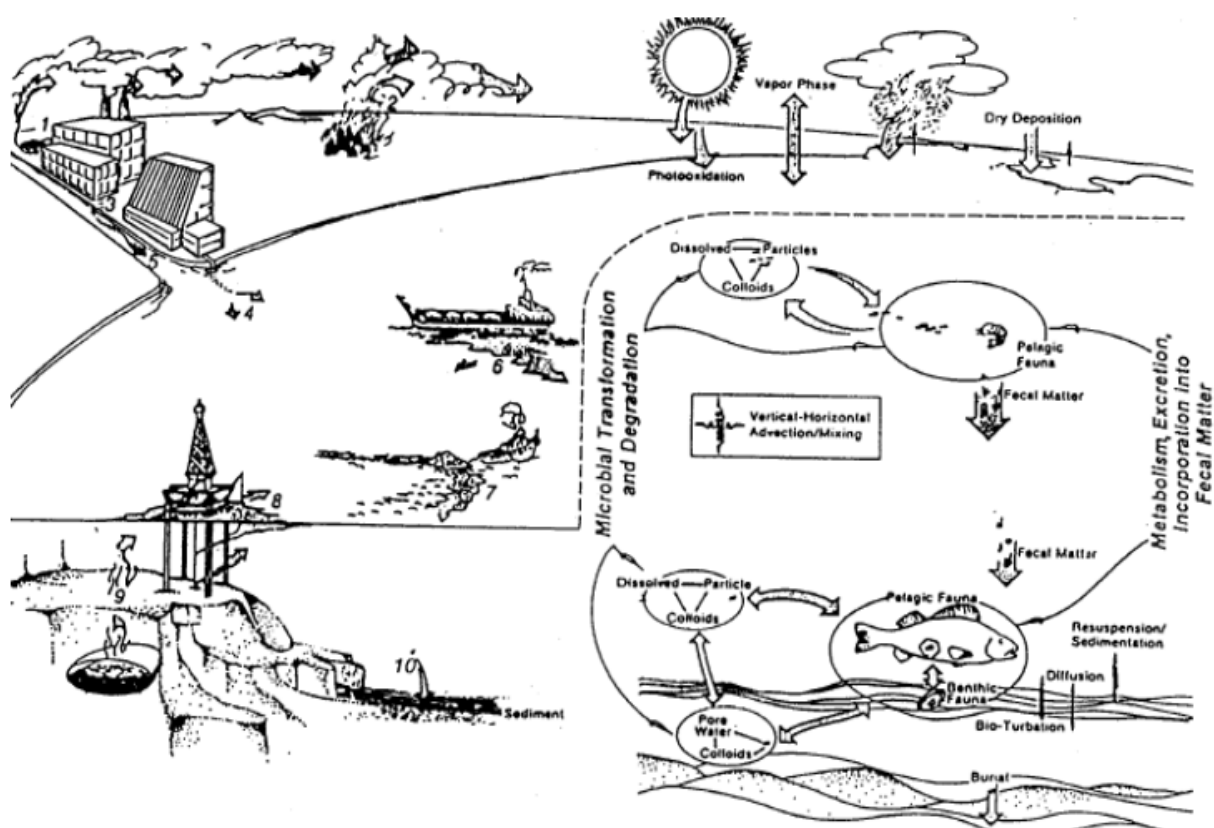


Figure I.12 Schéma récapitulatif des cycles biogéochimiques des HAP dans l'environnement (McElroy et Sisson, 1989).

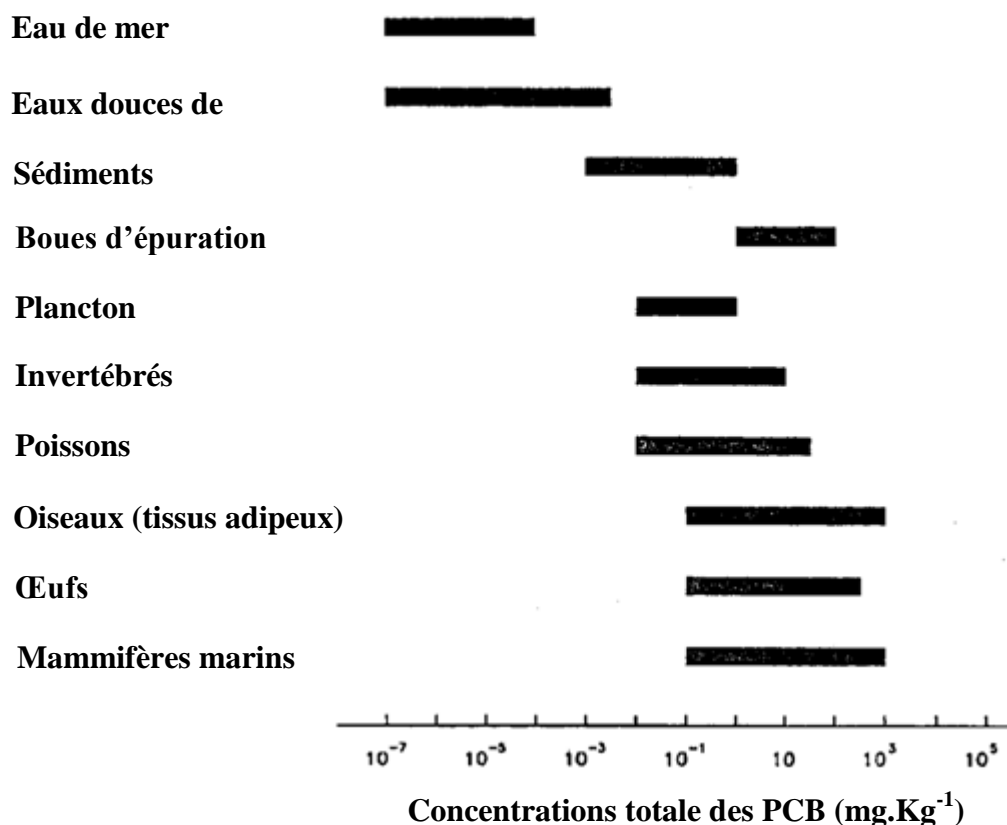


Figure I.13 Concentrations des PCB dans les milieux récepteurs et le biote (Pearson, 1982).

Les PCB, sont peu sensibles aux processus d'hydrolyse (Wang, 1998), par contre la photolyse est le mécanisme de dégradation chimique prépondérant pour ces composés. Les PBDE, comme les PCB, sont des molécules stables, mais il a été mis en évidence des mécanismes de débromation du décaBDE sous l'effet des UV (Ahn et al., 2006). Les composés les plus bromés sont les plus sensibles à ces dégradations qui aboutissent à la formation de composés moins bromés, qui pour certains d'entre eux présentent des capacités d'accumulation dans les organismes vivants supérieures à la molécule d'origine (Eriksson et al., 2004). Les composés les plus lourds sont moins mobiles dans l'environnement que les composés plus légers, sans doute à cause de leur volatilité plus faible et de leur absorption plus forte aux sédiments. Les PBDE ont un comportement dans l'environnement équivalent aux composés chlorés (Figure I.14) (Watanabe et Sakai, 2003). Les PCB et les PBDE sont également dégradés par le compartiment biologique notamment par les microorganismes. Ces mécanismes de dégradation dépendent des espèces bactériennes considérées, des conditions environnementales (température, pH, nutriments...) et des congénères considérés. La capacité de métabolisation par les bactéries diminue avec la masse atomique (Cl>Br) et la stéréochimie (para > méta > ortho) (Hakk et Letcher, 2003).

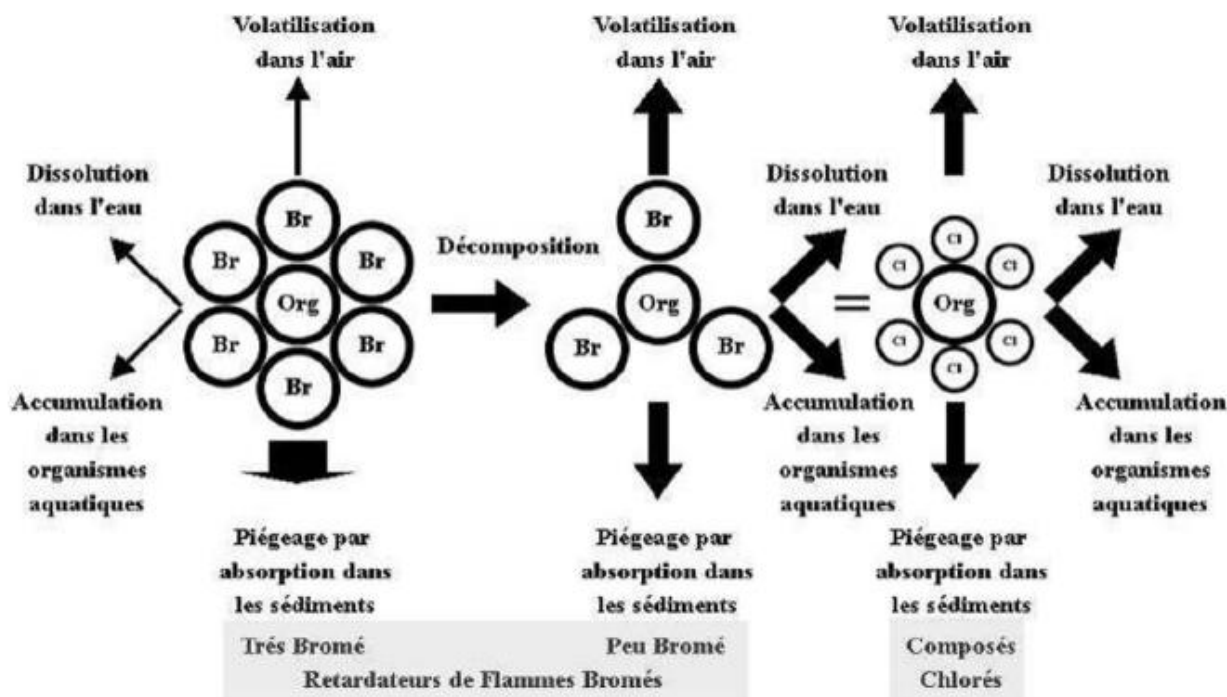


Figure I.14 Devenir des PBDE dans l'environnement (Watanabe et Sakai, 2003).

Après leur épandage sur les cultures, les pesticides peuvent se volatiliser vers l'atmosphère, se fixer dans le sol, être entraînés par l'eau en profondeur, ou encore se retrouver dans les eaux de ruissellement superficielles. Dès leur introduction dans l'environnement, les pesticides organochlorés peuvent être soumis à une dégradation physique (Mansour et al., 1988), chimique (Chapman et Cole 1982; Chapman et Harris, 1982) ou biologique (Chapman et Cole, 1982; Chapman et Harris, 1982; Arbeli et Fuentes, 2007; Krishna et Philip, 2009) (Figure I.15). Dans les écosystèmes aquatiques, les micropolluants organochlorés subissent des répartitions continues entre les interfaces air-eau, eau-eau, eau-sédiment, eau-biota, sédiment-biota, biota-biota et c'est cette répartition entre l'eau et les matrices biotiques et abiotiques qui déterminent finalement leur dynamique et leur impact écotoxicologique.

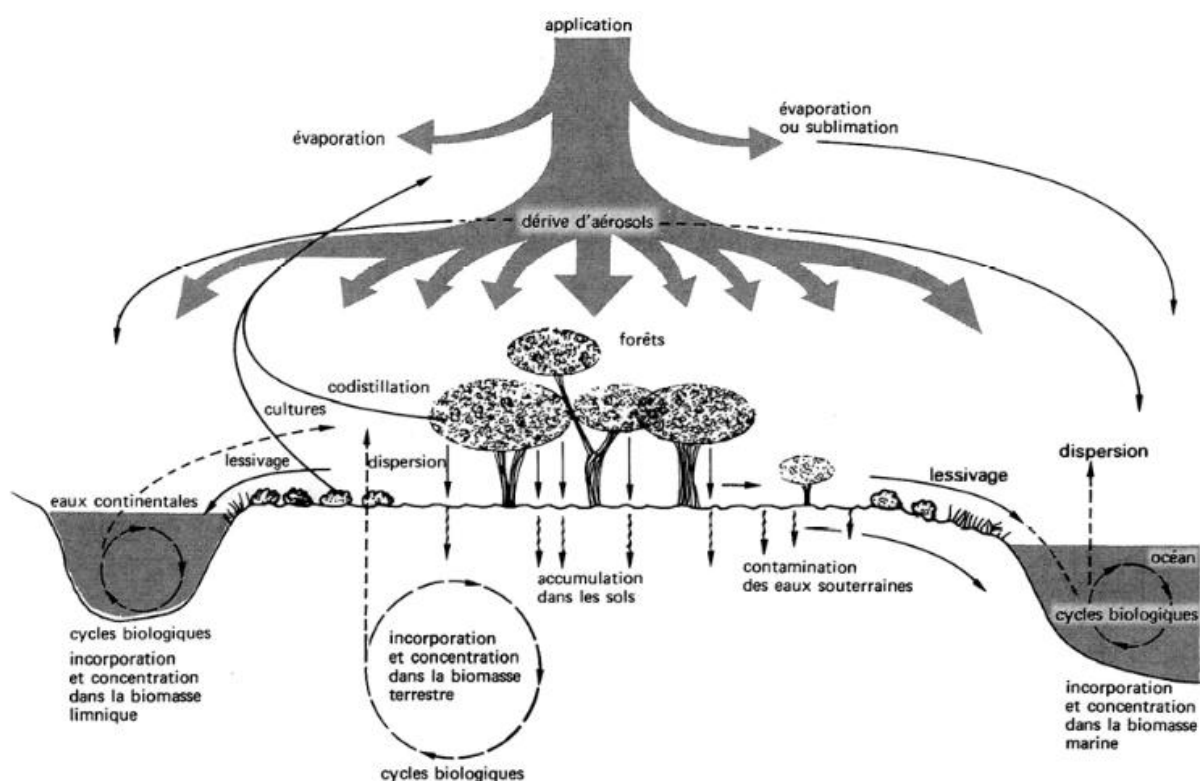


Figure I.15 Mouvement des pesticides dans la Biosphère (Ramade, 1998).

Comme les polluants organiques persistants, les éléments traces métalliques participent aux grands cycles biogéochimiques (Nriagu et Pacyna, 1988). Ces cycles comprennent de grands réservoirs: l'Atmosphère, l'Océan et les Continents (Figure I.16).

Le devenir des métaux et des organométaux dans l'environnement est régi par un ensemble de processus physico-chimiques et biologiques à l'origine de leur transfert entre les différents compartiments environnementaux (Figure I.17). Certaines espèces sont peu réactives comme les espèces sulfurées stockées dans la partie anoxique du sédiment. D'autres espèces lipophiles sont plus facilement accumulées, transformées ou métabolisées par les organismes vivants (Lascourrèges, 1996). Par ailleurs, les microorganismes tels que les bactéries jouent un rôle essentiel dans la transformation des composés métalliques et organométalliques. Ainsi dans la zone anoxique des sédiments, les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont responsables de la dégradation de la matière organique. Cette activité bactérienne entraîne la production de sulfures qui piègent certains éléments comme le fer par exemple, sous forme de sulfures métalliques. A l'interface zone oxique/zone anoxique, d'autres bactéries telles que les bactéries sulfo-oxydantes (BSO) oxydent les sulfures (ou certains métaux réduits) et produisent de l'acide sulfurique. Cette production d'acide sulfurique entraîne une diminution du pH qui favorise la remobilisation des métaux (Lascourrèges, 1996).

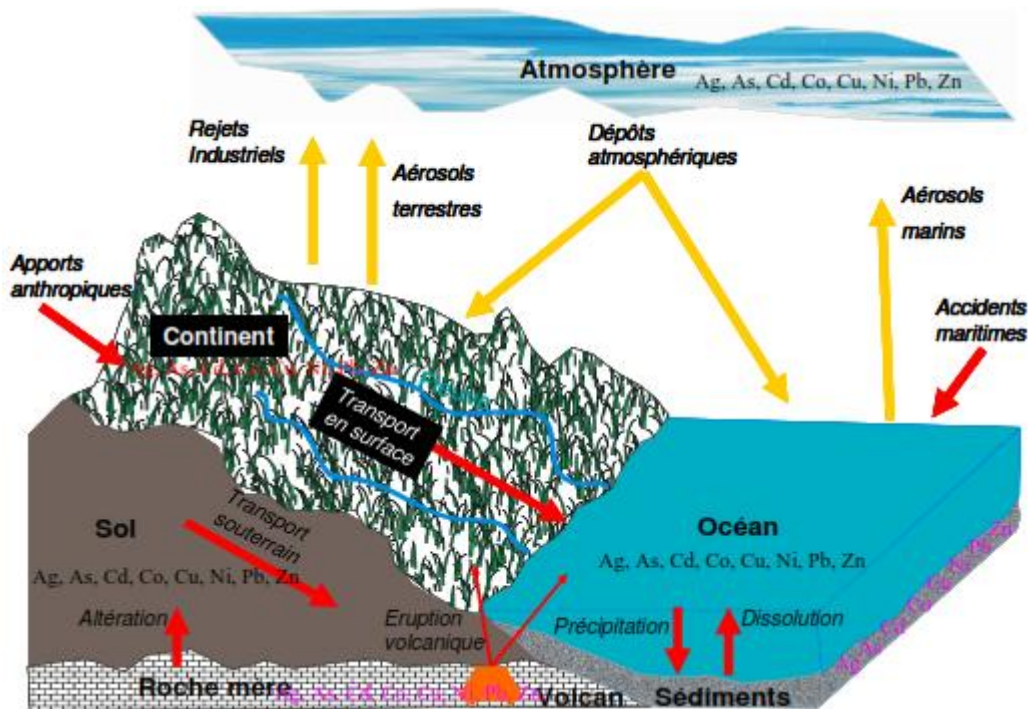


Figure I.16 Description schématique du cycle des éléments traces dans l'environnement. (modifié N'guessan, 2008).

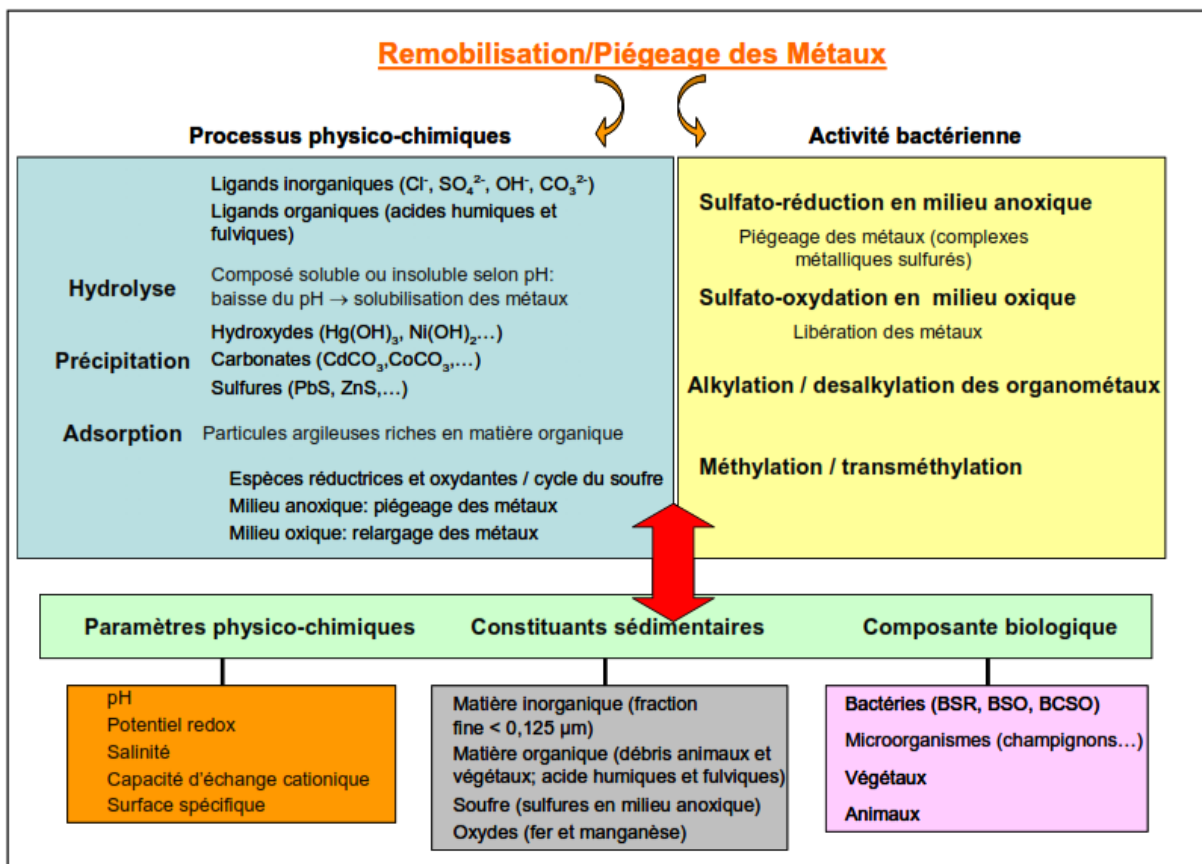


Figure I.17 Principaux paramètres et processus intervenant dans le cycle biogéochimique des métaux (Benoit, 2005)

II.7 Bioconcentration, bioaccumulation et bioamplification des polluants

L'estimation ou le calcul de la concentration d'une substance dans un milieu (air, eau et sédiment), qu'elle soit essentielle ou toxique, n'apporte aucune information réelle sur le fait qu'elle pourra être absorbée ou non par les organismes vivants. Différents termes sont employés pour désigner les processus qui définissent le devenir des contaminants dans les différents compartiments de l'environnement (physique ou biologique):

- la bioconcentration est définie comme le processus par lequel une substance se trouve présente dans un organisme vivant à une concentration supérieure à celle de son milieu aquatique environnant. Le facteur de bioconcentration (FBC) est défini par le rapport de la concentration d'une substance à l'intérieur d'un organisme à sa concentration dans l'eau, compte tenu seulement de l'absorption provenant du milieu ambiant (Veith et al., 1979; Ramade, 1992).

- La bioaccumulation désigne la capacité des organismes à concentrer et stocker les substances chimiques à partir de l'eau dans le cas des organismes aquatiques et/ou à partir de la nourriture. Elle dépend en premier lieu de la nature chimique des composés, et tout particulièrement de leur hydrophobicité et de leur persistance.

- la bioamplification correspond au processus selon lequel la concentration d'un composé chimique dans un organisme est supérieure à celle de la proie qu'il consomme (Gobas et Morrison, 2000). Le facteur de bioamplification (FBA) peut être défini comme une constante issue du rapport de la concentration d'une substance dans le prédateur sur la concentration dans la proie.

En général, la contamination d'une espèce résulte de l'équilibre entre l'assimilation et l'élimination d'une substance chimique. Le processus de transfert représente le flux de contaminants entre les différents compartiments abiotiques et biotiques. L'accumulation représente la quantité stockée dans chacun des compartiments. La bioaccumulation est donc le résultat des processus par lesquels le contaminant entre dans l'organisme, et les processus de décontamination ou élimination de cette substance (excrétion, biotransformation) (Ribeyre et Boudou, 1989). L'ensemble des mécanismes influençant la bioaccumulation dans un organisme défini est illustré Figure I.18.

En milieu aquatique, la capacité d'une substance à pouvoir être bioconcentrée par les organismes peut être appréhendée à partir du coefficient de partage octanol-eau (Kow) ce qui correspond au rapport entre la concentration d'une substance dans l'octanol et sa concentration

dans l'eau. Il fournit une estimation de l'affinité d'une substance pour la matière organique (lipides des organismes vivants par exemple).

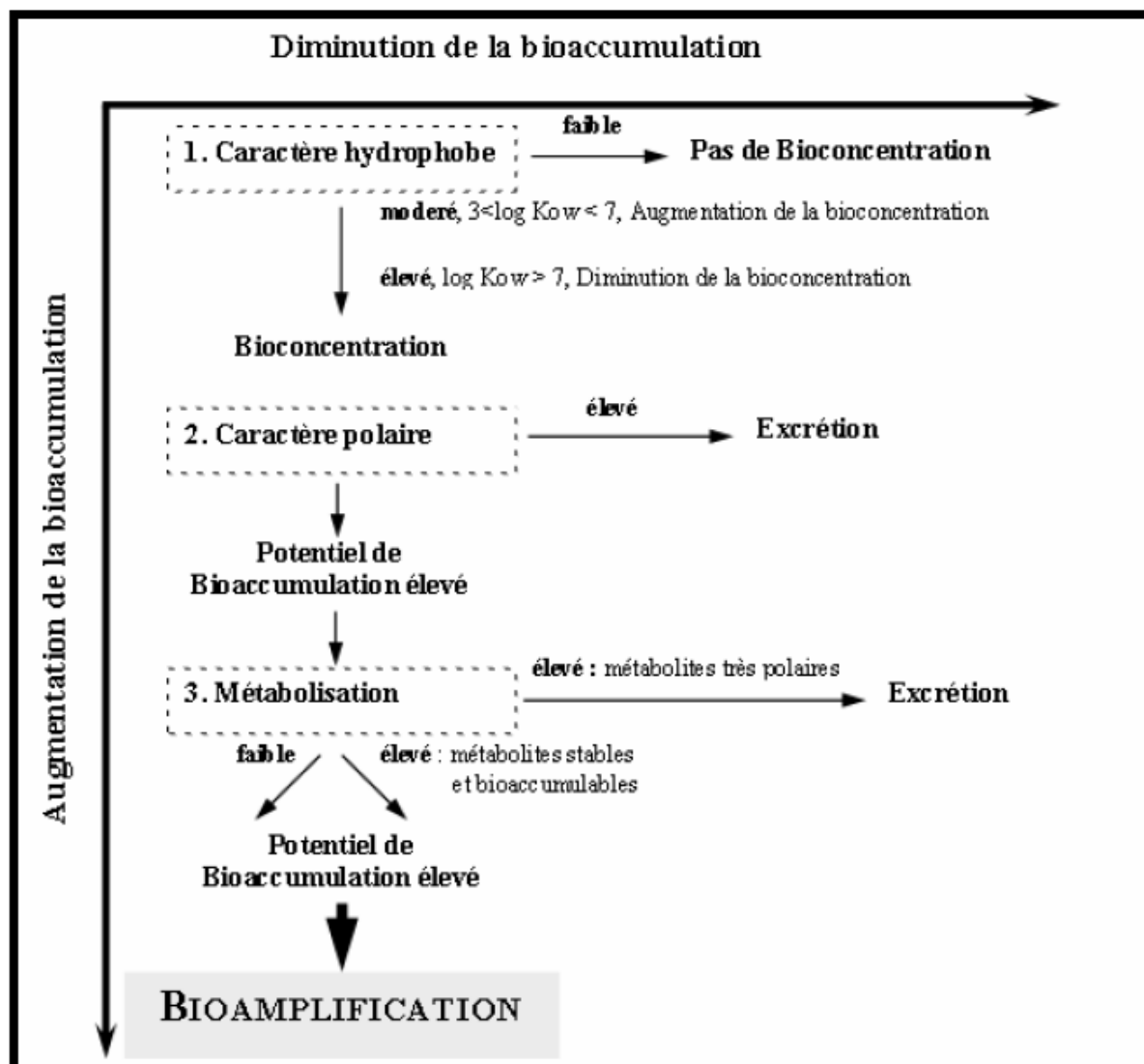


Figure I.18 Propriétés physico-chimiques des contaminants agissant sur leur bioaccumulation (Norstrom et Letcher, 1996).

Dans l'environnement marin, l'intégration des contaminants au cycle de la matière vivante se fait par adsorption des substances dissoutes aux matières en suspension, inertes ou planctoniques (Harding, 1986). Ce processus, phénomène de surface, est d'autant plus important que les particules sont de taille réduite (Brown et al., 1982). L'adsorption dépend également de la nature des particules, de leur teneur en matière organique et en lipides. Enfin, l'adsorption augmente avec le caractère hydrophobes des composés (coefficient octanol-eau élevé ($\log K_{ow} > 3$)). La bioconcentration dépend donc des caractéristiques physico-chimiques des contaminants. Les organismes vont absorber ces particules et les composés les plus hydrophobes seront stockés dans des tissus riches en lipides où ils auront tendance à

s'accumuler en raison de leur caractère persistant. Si les contaminants sont lentement métabolisés, ils vont également pouvoir s'accumuler à chaque niveau de transfert entre proie et prédateur. Les grandes fonctions biologiques, comme la respiration, l'alimentation, la croissance et la reproduction peuvent influencer sur la contamination et l'élimination des contaminants organohalogénés des organismes.

II.8 Métabolisation des micropolluants

Lorsqu'un xénobiotique (HAP, PCB, OCP et pesticide) est absorbé dans l'organisme par voie respiratoire, digestive ou cutanée, il est pris en charge par les systèmes enzymatiques de métabolisation qui impliquent les Cyt. P450 (Phase I ou phase de fonctionnalisation) qui métabolisent les xénobiotiques par divers réactions (oxydation, réduction et hydrolyse) qui conduisent en générale à des époxydes instables qui peuvent être soit détoxifiés par les enzymes de la phase II (Glutathion S-transférase, Glucurono et sulfo transférases, nitro-réductase...) et éliminées dans l'urine, soit qu'ils acquièrent des propriétés électrophiles qui les rendent capables de se fixer aux sites nucléophiles des macromolécules de l'organisme et exercent son potentiel toxique (Figure I.19).

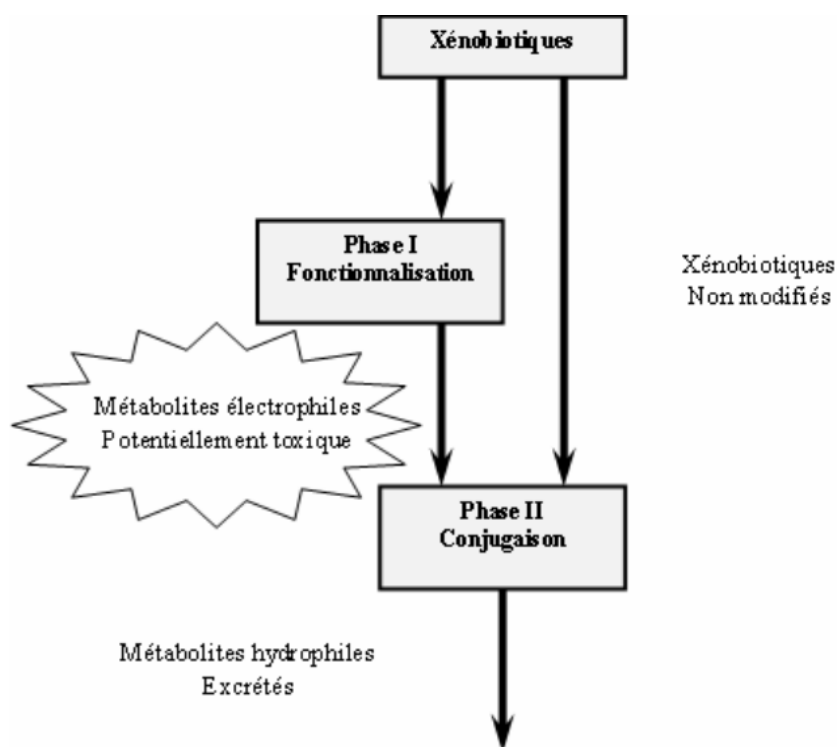


Figure I.19 Schéma synthétique des mécanismes de biotransformation des xénobiotiques.

II.8.1 Métabolisation des HAP

La biotransformation métabolique des HAP, et en particulier celui du B(a)P, a fait l'objet de nombreuses études expérimentales. Schématiquement, il s'agit d'un métabolisme enzymatique qui s'effectue en deux étapes qui sont représentées de façon simplifiée dans la Figure I.20.

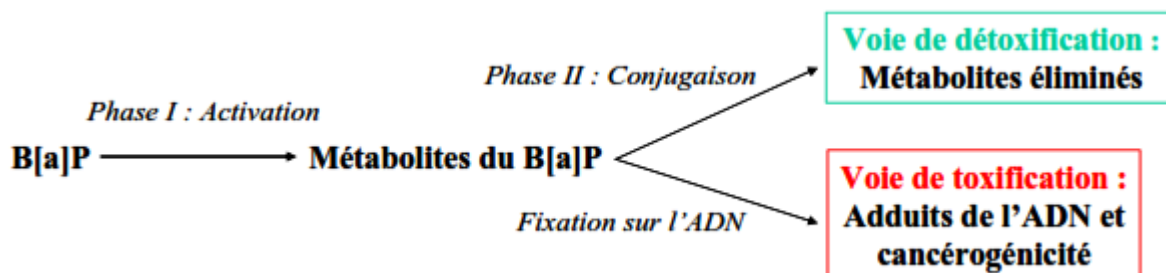


Figure I.20 Métabolisme simplifié du B[a]P.

La phase I d'activation métabolique comprend trois voies présentées dans la Figure I.21 et détaillées une par une par la suite.

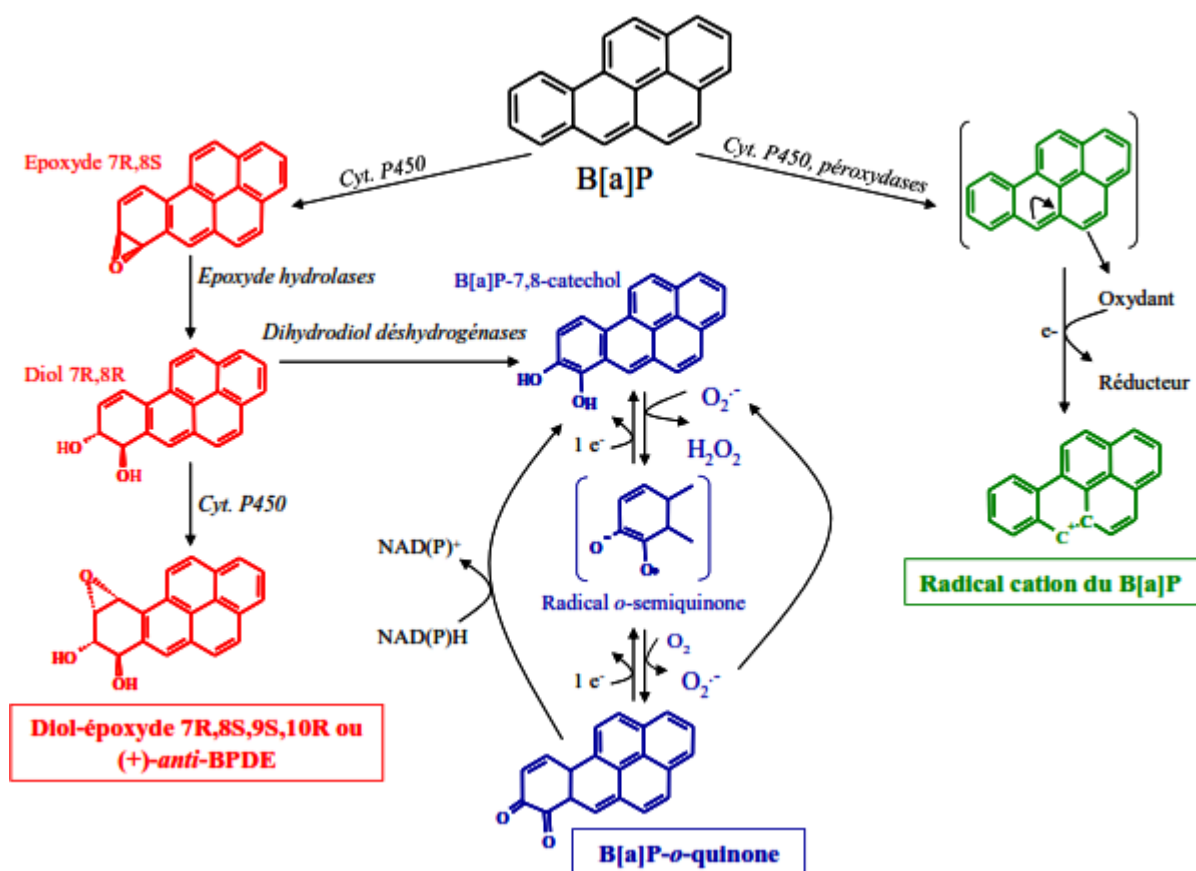


Figure I.21 Voies d'activation métabolique du B[a]P (Marie, 2007).

* La voie de mono-oxygénation par les Cyt. P450

Cette voie métabolique implique les Cyt. P450 qui métabolisent les HAP par des réactions de mono-oxygénation qui entraînent la formation d'un époxyde sur les carbones C7 et C8. L'hydrolyse de cet époxyde conduit à la formation d'un diol qui, après une nouvelle époxydation sur les carbones C9 et C10 par les Cyt. P450, se transforme en un diol-époxyde, ou 7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo[a]pyrène (BPDE), appelé métabolite ultime du B(a)P pour sa réactivité vis-à-vis de l'ADN (Acide désoxyribonucléique). Cet époxyde comporte deux diastéréoisomères syn et anti. Chacun des deux diastéréoisomères possède également deux énantiomères optiquement actifs (+) ou (-), ce qui conduit à l'existence de quatre isomères du BPDE (Geacintov et al., 1997).

Dans des fractions microsomales de foie de rat, la stéréosélectivité des enzymes des Cyt. P450 entraîne presque exclusivement la formation de l'époxyde 7R,8S (Yang, 1988) qui est ensuite hydrolysé préférentiellement en diol 7R,8R (Levin et al., 2002). Les fractions microsomales correspondent à des fragments de réticulum endoplasmique qui peuvent-être isolés des tissus par ultra-centrifugation (Luch, 2005). Le diol 7R,8R est finalement converti majoritairement en diol-époxyde 7R,8S,9S,10R, soit l'isomère (+)-anti-BPDE dans des fractions microsomales de foie de rat (Xue et al., 2005). La voie de formation de ce diolépoxyde est représentée dans la Figure I.21.

Notons que les Cyt. P450 ne participent pas uniquement à l'activation métabolique des HAP par la formation de diol-époxydes. D'autres activités enzymatiques, telles que des hydroxylations, permettent la formation de dérivés phénoliques du B(a)P tels que le 3-hydroxybenzo[a]pyrène (3-OH[a]P) (Besarati Nia et al., 2002). Ces composés non électrophiles ne sont pas réactifs vis-à-vis de l'ADN et sont éliminés après conjugaison.

* La voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases

Le mécanisme chimique de cette voie est basé sur l'arrachement d'un électron au B(a)P via une oxydation mono-électronique par les activités peroxydases des Cyt. P450. Elle conduit à la formation de radicaux cations du B(a)P électrophiles et réactifs vis-à-vis de l'ADN.

* La voie de formation des quinones du B(a)P par les aldo-kéto réductases (AKR)

La troisième voie métabolique met en jeu des dihydrodiol déshydrogénases de la famille des AKR qui métabolisent le B(a)P-diols en catéchols. Suite à des réaction d'oxydo-réduction le catéchol est transformé en benzo[a]pyrène-7,8-dione ou B[a]P-o-quinone, espèce électrophile réactive vis-à-vis de l'ADN (Xue et al., 2005). Les quinones possèdent également une forte

réactivité pour les thiols, le glutathion et la cystéine, permettant la formation de conjugués hydrosolubles facilement éliminés. De plus, cette voie métabolique entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Le métabolisme du B(a)P est complexe, et entraîne la formation de nombreux métabolites, de type phénols en 1-, 7- et 9-, diols en 4,5- , 7,8- et 9,10- , quinone en 1,6- , 3,6-, et 6,12- , ou encore triols, tétraols et époxydes du B(a)P (Peltonem et Dipple, 1995). La phase II de conjugaison permet l'élimination urinaire de ces métabolites sous forme glucurono- (Figure I.22A), ou sulfo-conjuguée (Figure I.22B), mais aussi après liaison au glutathion qui prend en charge les composés électrophiles comme les époxydes, les radicaux cations et les quinones (Figure I.22C). Des combinaisons sont ensuite possibles entre ces voies de conjugaison donnant lieu à des composés di-sulfates ou di-glucuronides ou encore sulfoglucuronide. Concernant la conjugaison au glutathion, il ne s'agit pas de la forme majoritaire retrouvée dans l'urine, car le conjugué du glutathion subit des transformations métaboliques aboutissant à l'excrétion urinaire finale de conjugués de la N-acétyl-cystéine ou acide mercapturique (Haufrond et Lison, 2005). L'étude des métabolites urinaires excrétés par des rats soumis à une dose unique de B(a)P marqué au ^{14}C montre que les conjugués de la N-acétylcystéine représentent 50 % de la radioactivité totale excrétée, les conjugués sulfo-glucuronidés 30 %, et un conjugué du glutathion n'a été retrouvé qu'à l'état de traces (Yang et al., 1999).

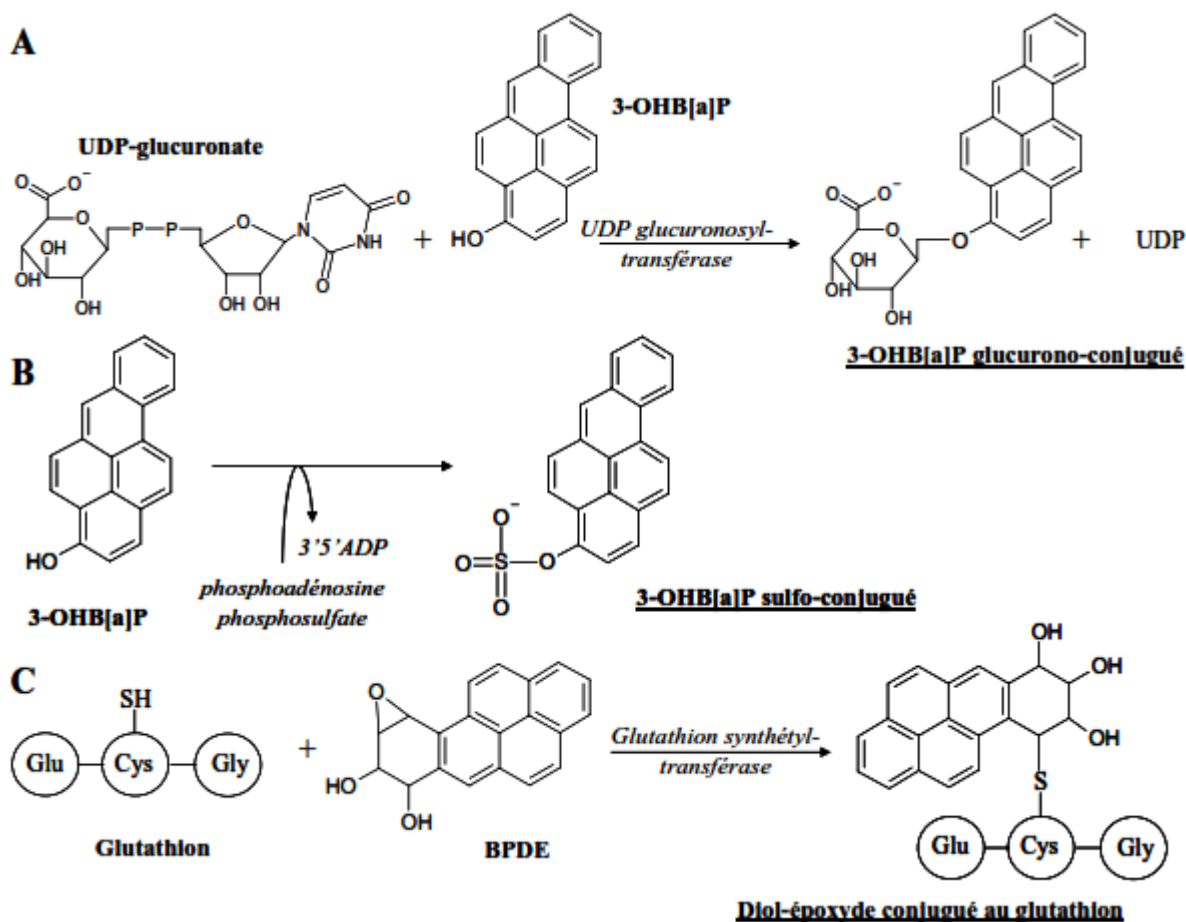


Figure I.22 Voies de conjugaison des métabolites du B(a)P avec l'exemple du 3-OH[a]P et du BPDE. A: glucurono-conjugaison, B: sulfo-conjugaison, C: conjugaison au glutathion.

II.8.2 Métabolisation des PCB

La biotransformation des PCB dépend de leur structure moléculaire et plus précisément du positionnement des atomes de chlore sur le cycle biphenyle (Boon et al., 1992). Pour être facilement biodégradés, les congénères doivent présenter une paire d'atomes d'hydrogène vicinaux en position méta ou para. L'augmentation du nombre de substitutions de chlore en position ortho diminue la vitesse de métabolisation. La Figure I.23 adaptée d'après Cravedi et Narbonne (2002) illustre les voies de métabolisation supposées des PCB. La première étape de métabolisation fait intervenir des cytochromes P450 particuliers comme le CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2 et vraisemblablement le CYP3A chez l'homme. Les PCB coplanaires inducteurs des CYP1A sont préférentiellement oxydés par ces iso-enzymes ; il est à noter que les mécanismes d'hydroxylation de ce type de composés ont lieu de façon préférentielle sur le carbone en para du cycle le moins chloré. Au contraire, les PCB

globulaires sont plutôt métabolisés par les CYP2B et l'hydroxylation se produit surtout sur une position en méta libre. Il faut également noter que l'oxydation des PCB peut entraîner une déchloration de la molécule. Ces capacités de métabolisation varient selon l'espèce et augmentent de façon générale avec le niveau trophique et le niveau d'organisation (Tanabe et Tatsukawa, 1986). Les métabolites hydroxylés ainsi formés sont excrétés par les voies naturelles, soit directement, soit après conjugaison avec l'acide glucuronique, un groupement sulfate ou le glutathion.

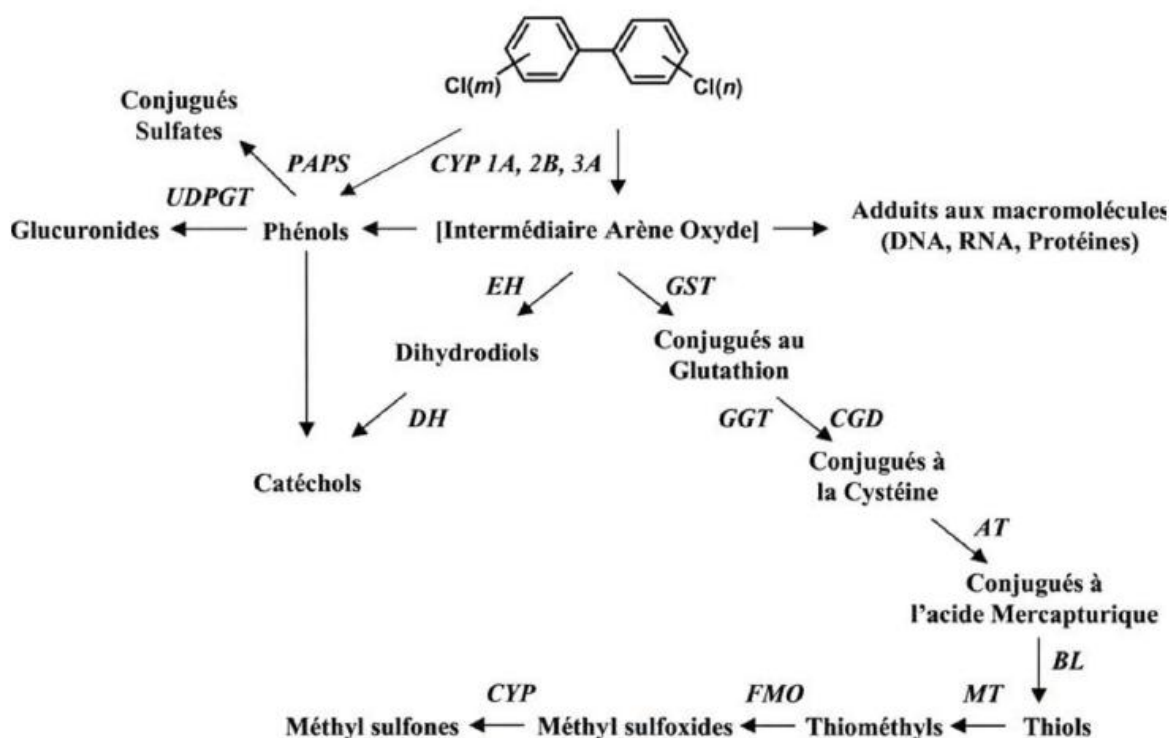


Figure I.23 Schéma de la métabolisation des PCB (Cravedi et Narbonne, 2002).

II.8.3 Métabolisation des PBDE

Tout comme les PCB, la biotransformation des PBDE dépend de leur structure moléculaire. Ce sont a priori des inducteurs des enzymes de phase I et II (De Wit, 2002).

La biotransformation des PBDE a été clairement mise en évidence par dosage de métabolites hydroxylés (OH- et/ou -MeO-PBDE) dans différentes espèces (bactéries, poissons, mammifères) (Hakk et Letcher, 2003; Buckman et al., 2006). Cette biodégradation a été également mise en évidence in vitro (De Wit, 2002; De Boer et al., 1998). La présence de ces métabolites confirme qu'une partie des PBDE est dégradée par les cytochromes P450 durant la phase I; ces systèmes enzymatiques sont vraisemblablement les mêmes que dans le cas des PCB le CYP 1A1 et le CYP A2 (De Wit, 2002).

II.8.4 Métabolisation des OCP

Les animaux sont exposés par ingestion de contaminants présents dans leur alimentation ou dans l'eau, par inhalation ou par absorption à travers les épithéliums. Le niveau de pénétration à travers la peau varie suivant les molécules: de très faible pour le DDT à très fort pour le dieldrine (Smith, 1991).

La métabolisation des OCP diffère fortement d'une molécule à l'autre. Généralement ces composés, se dégradent très lentement dans l'organisme (plusieurs dizaines d'années pour le DDT). Le nombre des métabolites intermédiaires varie également fortement en fonction de la molécule (plus d'une dizaines de molécules recensées pour le lindane). En outre, les molécules de dégradation peuvent présenter une durée de vie dans l'organisme aussi longue que la molécule initiale avec des effets aussi délétères (cas du DDT qui se transforme en DDE).

Après absorption, les organochlorés sont transportés par voie sanguine, fixés aux lipoprotéines sériques. Ils atteignent rapidement les organes et tissus fortement irrigués (encéphale, reins, poumons) puis une redistribution secondaire les transporte vers les organes riches en lipides (graisse, cerveau, foie). Cette accumulation dans les graisses ajoutée à leur stabilité, font que les biotransformations sont faibles, lentes et difficiles.

Les voies et rythmes d'élimination varient en fonction de la molécule, le lindane ayant une élimination beaucoup plus rapide et complète que les autres molécules.

III. Evaluation de la qualité des sédiments

La structure, la composition et la diversité biologique des sédiments varient, même au sein d'un même site. Les différences physico-chimiques qui caractérisent les sédiments comme la taille et la forme des grains et leur composition notamment en matière organique, peuvent influencer profondément la biodisponibilité et le degré de toxicité des contaminants qui leur sont associés. De plus, l'écologie des organismes benthiques varie à un tel point que les comportements alimentaires, les exigences liées à l'habitat et la physiologie influencent l'exposition aux contaminants du benthos. Ces différences expliquent la diversité d'approches d'évaluation de la qualité des sédiments qui ont été mises au point jusqu'à présent.

Cette partie a pour but, de faire le point des connaissances actuelles sur différentes catégories d'indicateurs utilisés pour l'évaluation de la qualité des sédiments.

III.1 Indicateurs chimiques

Les analyses chimiques sont les outils les plus utilisés pour évaluer la contamination dans les sédiments. Les substances couramment analysées incluent les métaux traces, les HAP, les PCB, les pesticides et plusieurs autres composés organiques (tel que les dioxines et furanes, les chlorophénols et les phtalates). D'autres paramètres, tels que le carbone organique total (COT), la granulométrie, les sulfures volatils en milieu acide (SVMA), l'azote ammoniacal, et les sulfures d'hydrogène devraient également être inclus dans la liste afin d'aider à l'interprétation des résultats des paramètres prioritaires.

Les analyses chimiques procurent une information directe sur la présence et les concentrations de contaminants qui soulèvent certaines inquiétudes quant à leurs effets potentiels sur la santé des organismes benthiques. Néanmoins, elles ne permettent pas d'évaluer le risque toxique in situ (Prygiel et al., 1999), ni de prédire l'effet des polluants sur les invertébrés benthiques (Gunn, 1989; Bervoets et al., 1997; Prygiel et al., 1999). De plus, il n'est pas possible de doser tous les polluants pouvant être présents dans les sédiments. Plusieurs travaux montrent qu'une interaction entre plusieurs contaminants peut conduire de façon imprévisible à une synergie, un antagonisme ou une additivité des effets toxiques (Hass et al., 1981; Davol et al., 1989; Donnelly et al., 1990; Ma et al., 1991). De ce fait une méthode d'analyse biologique des sédiments devrait être appliquée en complément des analyses chimiques (Chapman, 1990; Prygiel et al., 1999) afin mesurer la toxicité globale du sédiment ou d'identifier certaines classes de polluants par leurs effets induits.

Les indicateurs écologiques (indices biotiques) sont également couramment utilisés pour évaluer la qualité des sédiments (Woodiwiss, 1964; Chandler, 1970; Armitage et al., 1983; DeShon, 1995; Chessman et McEvoy, 1998; Borja et al., 2000).

III.2 Indicateurs Ecotoxicologiques

III.2.1 Bioessais sur sédiment

Les tests de toxicité (*syn.* bioessais, essais toxicologiques) sont considérés comme étant les meilleurs outils présentement disponibles pour intégrer les effets de multiples contaminants (US EPA, 1991). Ces tests servent à établir un rapport entre la contamination d'un site et les effets biologiques connexes. Des organismes et des paramètres d'effet dont la sensibilité est établie sont habituellement choisis et une série ou batterie de tests peut être utilisée pour évaluer le potentiel toxique. Les tests biologiques présentent généralement différentes caractéristiques:

- Ils sont rapides et peu coûteux;
- Ils reflètent la toxicité de la fraction biodisponible des contaminants;
- Ils peuvent mettre en évidence la présence de contaminants non décelés par l'analyse chimique, ou que l'on ne sait pas doser;
- Ils sont réalisés en milieu contrôlé, les effets de facteurs pouvant rendre l'interprétation difficile comme dans le milieu naturel, sont limités.

Cependant, les bioessais ont également des limites; on connaît mal leur signification écologique et l'extrapolation des résultats au milieu naturel n'est pas toujours satisfaisante (voir Chapitre III pour plus de détails).

De nombreuses espèces sont utilisées comme organismes tests. Idéalement, les organismes choisis doivent être représentatifs du milieu testé (Keddy et al., 1994, 1995). Les espèces couramment utilisées sont des bivalves (*Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis*, etc.), des poissons (*Oryzias latipes*, *Danio rerio*, truite arc-en-ciel, etc.), des échinodermes (*Paracentrotus lividus*, *Arbacia punctulata*, *Strongylocentrotus purpuratus*), des amphipodes (*Rhepoxynius abronius*, *Ehaustorius estuarius*, *Corophium volutator*), des polychètes (*Neanthes arenaceodentata*, *Dinophilus gyrotilatus*), des organismes zooplanctoniques (*Acartia* sp.) des micoralgues (*Skeletonemas costatum*, *Phaedactylum tricornutum*) et des bactéries (*Vibrio fischeri*) (Chapman et Morgan, 1983; Swartz et al., 1985; Carr et al., 1989; ASTM, 1992, 1994a, 1994b; EPA, 1994; Long et Wilson, 1997; Carr, 1998; ISO, 1998; Thompson et al., 1999; Miller et al., 2000; Wu et al., 2009; Vicquelin et al., 2011).

Il est reconnu que les bioessais varient en terme de sensibilité au regard de produits toxiques spécifiques. De plus, la disponibilité biologique des divers produits toxiques dans un sédiment peut varier considérablement en fonction des organismes testés. En conséquence, il est relativement difficile de prévoir le test qui offre la meilleure sensibilité pour procéder à une caractérisation des effets biologiques, d'autant plus que les sédiments présentent souvent un mélange de divers polluants. C'est pourquoi il est recommandé d'utiliser une série de bioessais au lieu d'un seul. Une batterie de biotests doit comporter au moins trois niveaux trophiques différents (Ahlf et Förstner, 1988). Parmi les bioessais in vitro couramment utilisés on peut citer le test d'Ames, le SOS-Chromotest, Mutatox[®], Microtox[®] (Ames et al., 1975; Quillardet et al., 1982, 1985; Johnson, 1998; Qureshi et al., 1998). Il existe aussi de très nombreux bioessais in vivo pour caractériser la toxicité d'un sédiment: test sur *Corophium* sp et *Helicidaris tuberculata*, test sur larves de chironomes, tests sur larves de bivalves ou

d'oursin (*Paracentrotus lividus*)... (McCready et al., 2004; Cesnaitis et al., 2013; Montero et al., 2013).

Diverses phases sont également utilisées dans les essais de toxicité des sédiments: phase aqueuse (élutriats), phase organique (extrait organique), sédiment entier. Chacune présente des avantages et des inconvénients qui limitent leur applicabilité à toutes les situations et études. L'utilisation conjointe de ces phases permet de palier à certains inconvénients lorsque chaque phase est étudiée isolément (voir Chapitre III pour plus de détails).

III.2.2 Biomarqueurs biochimiques

La notion de biomarqueur a été définie par plusieurs auteurs (Lagadic et al., 1997; Galloway et Depledge, 2001; Van der Oost et al., 2003) comme étant un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, de l'organisme, de la population ou de l'écosystème qui peut être reliée à une exposition ou à des effets toxiques de polluants chimiques environnementaux.

L'étude de la réponse biologique des organismes vivants aux polluants chimiques présents dans l'environnement marin représente un outil de diagnostic qui n'est pas destiné à dupliquer ou remplacer la surveillance chimique, mais qui doit être intégré dans les programmes de surveillance de l'environnement. Complémentaires des analyses chimiques, ces indicateurs biologiques peuvent jouer le rôle de systèmes d'alarme précoces d'une contamination dont les effets sont réversibles. Par exemple, la spécificité d'un biomarqueur pour certaines familles de molécules chimiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles, métaux lourds, produits phytosanitaires...) permet d'une part de révéler la présence de ces polluants, et d'autre part de renseigner sur la biodisponibilité de ces polluants ainsi que sur les effets biologiques précoces sur les organismes (Kramer et Botterweg, 1991; Amiard et al., 1998).

Aucun biomarqueur ne peut à lui seul prendre en compte la diversité des contaminants et la multiplicité de leurs effets sur les organismes. Ainsi, la mise en oeuvre d'un ensemble cohérent de biomarqueurs s'est rapidement imposée afin d'établir un diagnostic complet de l'état de perturbation des organismes au sein de leur environnement (Van der Oost et al., 1996; Minier et al., 2000; Flammarion et al., 2002b). Chaque biomarqueur apporte alors une information en rapport avec sa spécificité et sa sensibilité. Ainsi seule une approche multiparamétrique, combinant la mesure de différents biomarqueurs, les analyses chimiques et les mesures au niveau des populations et des communautés, permettra de prendre en considération la multiplicité des effets de la contamination sur les différents niveaux

d'organisation (Figure I.24). En effet, les polluants agissent à tous les niveaux d'organisation biologique, de la molécule à l'individu avant même d'avoir des effets visibles aux niveaux supérieurs (à l'échelle des populations et des communautés). Ces réponses s'observent sur une échelle temporelle croissante à mesure que l'on monte dans les niveaux d'organisation biologique (Peakall et Shugart, 1993).

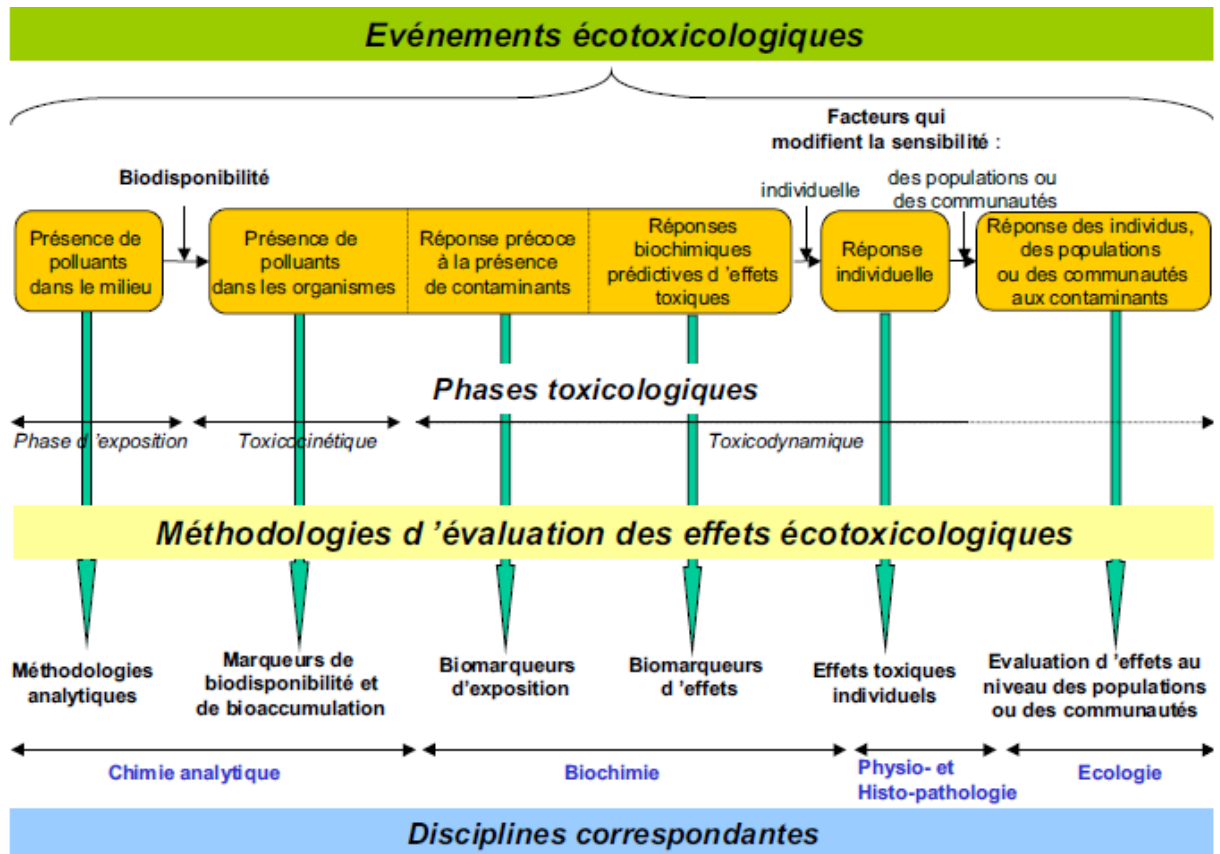


Figure I.24 Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxiques (modifié d'après Lagadic et al., 1997).

Nous allons présenter successivement quelques exemples de biomarqueurs biochimiques étudiés chez les poissons et les bivalves qui traduisent respectivement l'exposition des organismes à certaines familles de composés (voir Chapitre IV pour plus de détails).

III.2.2.1 L'activité acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase est une enzyme impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux. Elle catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique (Matozzo et al., 2005).

Dans les jonctions neuromusculaires et interneurales, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui va permettre la transmission de l'influx nerveux

(Figure I.25). Lors d'une stimulation nerveuse, l'acétylcholine libérée des terminaisons nerveuses dans l'espace synaptique, active les récepteurs cholinergiques postsynaptiques. L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur provoque une dépolarisation de la membrane post-synaptique, générant ainsi un potentiel d'action qui assure la transmission du signal nerveux. L'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase, permet au système de revenir à son état de repos (Bocquené et al., 1997). L'inhibition de l'AChE par de nombreux neurotoxiques entraîne l'accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique, qui maintient de ce fait une transmission permanente de l'influx nerveux, laquelle conduit généralement à la tétanie musculaire et à la mort de l'organisme (Matozzo et al., 2005). La mesure de l'inhibition de cette activité enzymatique constitue un marqueur dont l'expression traduit spécifiquement l'exposition des organismes à différents contaminants et notamment certains produits phytosanitaires. L'AChE constitue en effet la cible privilégiée de certains insecticides (organophosphorés, carbamates), herbicides (triazines, paraquat) et autres molécules neurotoxiques (incluant les métaux lourds). Surtout utilisée en milieu marin (Galgani et Bocquené, 1998), l'inhibition de l'activité de l'AChE s'est également révélée intéressante dans le cadre d'étude de la qualité des milieux aquatiques continentaux (Payne et al., 1996; Flammarion et al., 1998a; Flammarion et al., 1998b; Sturm et al., 1999; Barra et al., 2001).

L'activité de l'AChE peut également être modulée par la température du milieu, et certains facteurs intrinsèques, tels que la taille des organismes (Flammarion et al., 2002a). Enfin, l'inhibition de l'AChE peut être réversible (particulièrement pour les AChE cérébrales affectées par les carbamates) et dans ces conditions, seules les diminutions importantes d'activité acétylcholinestérasique peuvent être décelées. Sur le terrain, les échantillons doivent être obtenus de manière synchrone sur une période de temps n'excédant pas quelques jours et dans des conditions climatiques comparables afin de garantir la représentativité des mesures des activités cholinestérases effectuées (Bocquené et al., 1997).

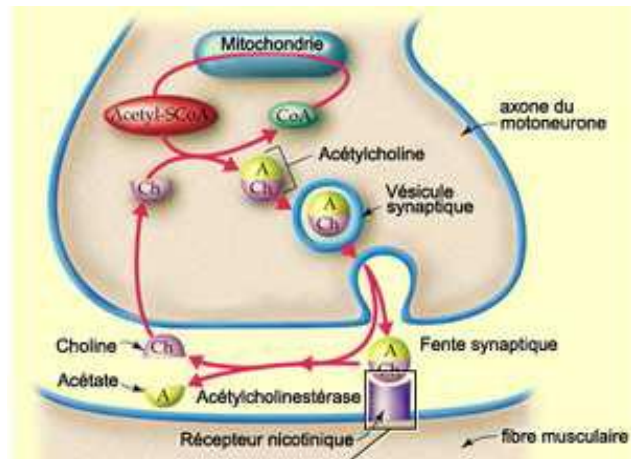


Figure I.25 Mécanisme d'action de L'acétylcholinestérase (<http://lecerveau.mcgill.ca/>).

III.2.2.2 L'activité éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD)

L'activité Ethoxyrésorufine O-dééthylase (EROD) est une activité catalytique du cytochrome P450 1A qui peut être induite suite à l'exposition des organismes à de nombreux xénobiotiques organiques de types HAP (Payne et al., 1987; Stegeman et al., 1987; Van der Oost et al., 1991, 1994; Burgeot et al., 1994), PCBs (Monod et al., 1988; Van der Oost et al., 1991, 1994; Goksoyr et Husoy, 1992; Burgeot et al., 1994), et pesticides organochlorés (Van der Oost et al., 1991, 1994). En effet ces xénobiotiques vont se lier sur le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) et entraîner une cascade réactionnelle débouchant sur la synthèse de nouvelles protéines P450. Il en résulte alors une augmentation de l'activité enzymatique associée qui peut être mesurée au laboratoire au travers de la réaction de dééthylation de 7 éthoxyrésorufine en résorufine fluorescente (Di Giulio et al., 1993; Machala et al., 1997; Flammarion et al., 1998a).

D'autres xénobiotiques peuvent induire l'activité EROD sans fixation sur l'AhR. C'est par exemple le cas des imidazoles¹⁰ (Bach et Snegaroff, 1989; Babin et al., 2005) qui induisent une activité EROD qui reste faible et transitoire comparativement à celle provoquée par les ligands du AhR. Certains contaminants environnementaux sont aussi des inhibiteurs de l'activité EROD en interagissant avec l'enzyme, diminuant ainsi l'activité catalytique, ou en exerçant une toxicité non spécifique (diminution de la synthèse des protéines, de l'hème...). Parmi les inhibiteurs connus de l'activité EROD figurent certains métaux lourds tels que le cadmium ou le cuivre (Flammarion et al., 1996; Stien et al., 1997), les pesticides organophosphorés (Flammarion et al., 1998a) et certains agonistes du récepteur des oestrogènes (ER) (Hasselberg et al., 2004; Vaccaro et al., 2005). De plus, à fortes doses,

certaines inducteurs comme le β -naphtoflavone, peuvent aussi inhiber l'activité EROD (Flammarion et al., 1999).

Au niveau européen, ce biomarqueur fait partie de la batterie de biomarqueurs utilisés dans le programme européen « Biological Markers of environmental contamination in marine ecosystem BIOMAR (1995-1998) et sont encore très présents dans le programme BEEP « Biological Effects of Environmental Pollution in marine coastal ecosystems » (2001-2003) lui faisant suite, en tant que biomarqueurs validés.

III.2.2.3 L'activité glutathion-S-transférase (GST)

Les GST sont des enzymes de métabolisation de la phase II, dont la fonction est de conjuguer à une molécule de glutathion (qui possède un groupement nucléophile -SH) une grande variété de substrats (porteurs de groupements électrophiles) pour permettre leur élimination. Ces enzymes sont généralement solubles (cytosoliques) et présentes sous plusieurs isoformes, dont certaines sont inductibles par les contaminants qu'elles rendent moins toxiques. Cette particularité en a fait une activité intéressante en tant que marqueur biochimique.

La GST se caractérise par une faible spécificité. En effet, divers contaminants peuvent induire cette enzyme. Certains de ces contaminants sont inducteurs des cytochromes P450 comme les HAPs et les PCBs plans et globulaires (Forlin et al., 1996; Hoarau et al., 2001) tels que le le prochloraz, le Diquat, l'Agral 90 ou encore l'E2 (Sanchez et al., 2008), le paraquat (Stephensen et al., 2002), le Nonylphénol (Uguz et al., 2003) ou l'EE2 (Greco et al., 2007) mais également par un grand nombre d'autres molécules tels que les métaux et les organophosphorés (Monteiro et al., 2006). Regoli et al. (1998) ont observé une inhibition de l'activité GST chez des bivalves *Adamussium colbecki* contaminées par du cuivre et du mercure. Regoli et Principato (1995) n'ont observé aucune induction de l'activité GST chez des moules *Mytilus galloprovincialis* également exposées à des métaux traces.

III.2.2.4 L'activité catalase (CAT)

La CAT est un enzyme héminique localisée dans les peroxysomes d'un grand nombre de tissus, essentiellement le foie et les globules rouges où elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Stegeman et al., 1992; Cossu et al., 1997).

Les catalases sont présentes dans tout le règne animal et se retrouvent aussi chez les végétaux. Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif au niveau des membranes cellulaires, comme les HAP, PCB ou certains pesticides (Livingstone, 1993; Solé et al., 1995; Dellali et al., 2001a) et les métaux (Labrot et al., 1996).

L'augmentation de l'activité catalase a déjà été relevée chez des poissons et des bivalves exposés à des polluants organiques (HAP, PCB, pesticides et engrais chimiques) (Rodriguez-Ariza et al., 1993; Cossu et al., 1997). Par ailleurs, les travaux effectués sur les biomarqueurs de stress oxydant en laboratoire et surtout *in situ* montrent que le caractère non spécifique de leur réponse constitue un avantage comme indicateur d'un état de pollution mixte (Cossu et al., 1997).

III.2.2.5 Les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

Les TBARS est un indicateur de la lipopéroxydation (Sunderman et al., 1985; Pompella et al., 1987). Ce paramètre est largement utilisé *in situ* et est décrit comme un biomarqueur d'intérêt pour caractériser l'impact de la contamination des écosystèmes sur les organismes (Geret et al., 2003; Oakes et Van Der Kraak, 2003). Il se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générées par des contaminants comme les HAP, PCB ou métaux. Les hydroperoxydes ainsi formés se décomposent en intermédiaires radicalaires et en aldéhydes dont un des représentants les plus réactifs est le malonedialdéhyde (MDA).

III.3 Approches intégrées

Afin d'aider les gestionnaires du milieu aquatique, de nombreux outils ont été créés afin de déterminer si les contaminants métalliques ou organiques associés au sédiment peuvent affecter de manière négative les organismes aquatiques. Des valeurs guides sédimentaires (SQG, sediment quality guideline) ont ainsi été obtenues à partir des données de terrain (indicateurs chimiques, écologiques et toxicologiques).

Les valeurs guides sédimentaires sont de plus en plus utilisées en tant que points de référence et d'aide à l'interprétation des données sédimentaires (tendances historiques, identification des composés les plus problématiques). Elles peuvent également faciliter le classement des cours d'eau contaminés en fonction de la toxicité potentielle des sédiments et permettent l'identification des composés les plus problématiques et des sites susceptibles d'être étudiés et/ou restaurés (Geffard, 2001; Wenning, 2005).

Plus récemment Long et al. (1995) et MacDonalds et al. (1996) ont respectivement défini des seuils de toxicité et déterminé des valeurs ER-L (Effect Range low) et ER-M (Effect Range Medium) dans le premier cas et TEL (Threshold Effect Level) et PEL (Probable Effect Level) dans le second. Ces seuils ou critères de toxicité ont été obtenus de manière empirique, c'est à dire en compilant les résultats de nombreuses études réalisées soit au laboratoire, soit

en milieu naturel et pour lesquelles, le niveau de contamination et de toxicité des sédiments étaient disponibles. A partir de cette banque de données, ces auteurs ont défini pour chaque contaminant les concentrations pour lesquelles des effets biologiques sont rarement (en dessous des ERL et TEL), occasionnellement (entre les ER-L et ERM ou entre TEL et PEL) ou fréquemment rencontrés (au dessus des ER-M ou PEL). De cette façon, les seuils de toxicité développés prennent en compte les effets dus au mélange de contaminants ainsi que de nombreuses caractéristiques du sédiment. (Voir Chapitres II et III pour plus de détails).

IV. Les modèles biologiques étudiés

Cette partie comporte la présentation des caractéristiques générales de deux espèces bioindicatrices qui sont utilisés pour la biosurveillance de la lagune de Bizerte, la moule *Mytilus galloprovincialis* et le poisson Gobie *Zosterisessor ophiocephalus*. Leur systématique, écologie, physiologie, répartition géographique et leurs utilisations en tant qu'espèces sentinelles sont également présentées. La présentation du médaka japonais *Oryzias latipes* qui est utilisé comme bioessai pour l'évaluation de la qualité de sédiments est inclus dans cette partie.

IV.1 La moule *Mytilus galloprovincialis*

IV.1.1 Répartition géographique et systématique

L'aire de répartition de *Mytilus galloprovincialis* s'étend sur la côte atlantique depuis la baie d'Agadir (Maroc) jusqu'aux îles Britanniques et englobe, aussi, l'ensemble du bassin méditerranéen, l'Afrique du sud, la Nouvelle-Zélande et la Californie (McDonald et al., 1991) (Figure I.26). Leur biotope s'étend de la limite haute de l'étage médiolittoral supérieur jusqu'à des profondeurs de 6 à 9 m avec possibilité d'atteindre 30 à 40 m dans certaines régions comme la mer baltique.

La classification des Mollusques repose sur des critères anatomiques discriminant les grands axes taxonomiques, auxquels s'ajoute la distribution géographique. Le genre *Mytilus*, de la famille des Mytilidés (Pélécypodes) est principalement défini par la forme de la coquille, en particulier par son embout en position terminale. L'espèce *Mytilus galloprovincialis*, dite moule méditerranéenne (Lubet, 1959), est un Mollusque bivalve, dont la biologie est parfaitement connue (Lubet, 1959, 1963, 1973, 1981; Bayane et al., 1976; Lubet et Aloui, 1987; Narbonne et al., 2005).

La classification de la moule, *Mytilus galloprovincialis* s'établit comme suit (Turgeon et al., 1998):

Règne: Animal

Sous-règne: Métazoaires

Phylum: Mollusques

Classe: Bivalves

Sous-classe: Ptériomorphes

Ordre: Mytiloidés

Famille: Mytilidés

Genre: *Mytilus*

Espèce: *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

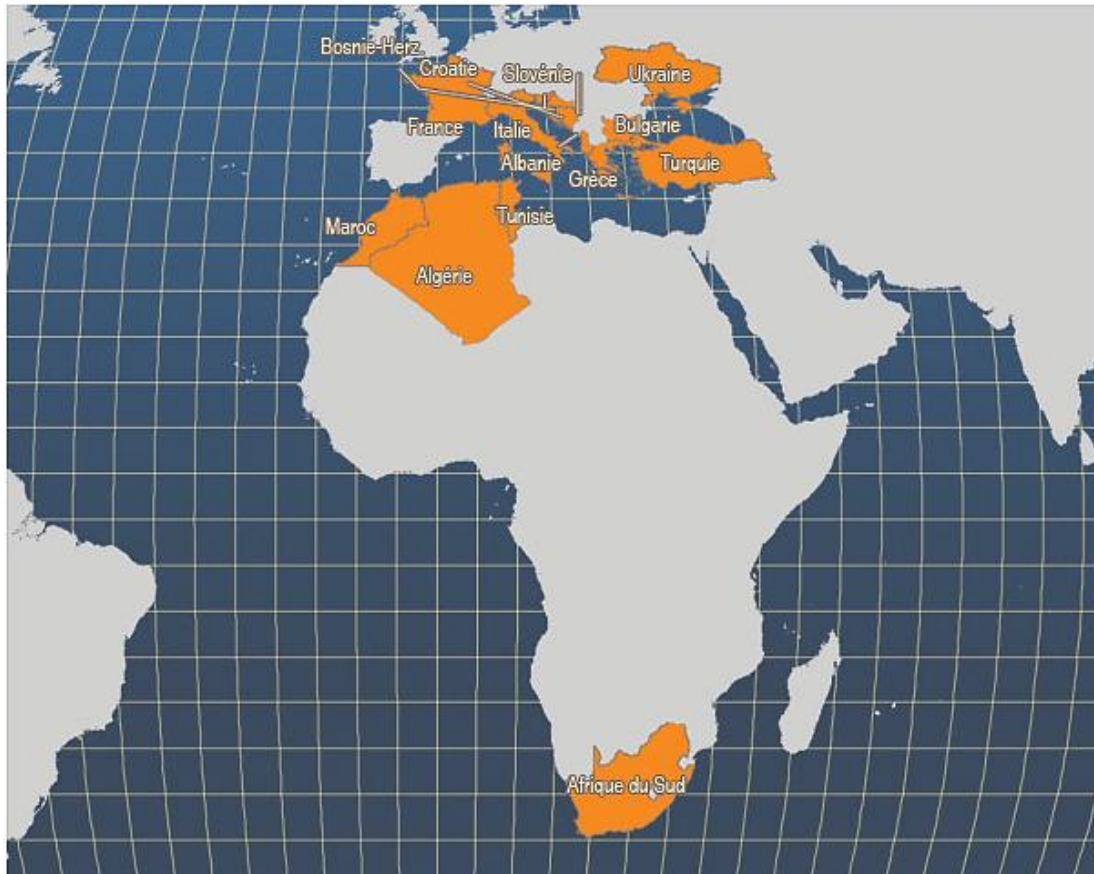


Figure I.26 L'aire de répartition de *Mytilus galloprovincialis* (Cahen, 2006).

IV.1.2 Ecologie

Les moules sont des espèces sessiles qui vivent fixées sur substrats durs dans la zone médiolittorale (zone intertidale), elles résistent aux courants, aux chocs des vagues et à l'arrachement grâce aux solides filaments du byssus qui sont soudés au rocher (Songy et Avezard, 1963).

Les moules recouvrent des rochers battus par les vagues, mais peuvent proliférer dans les estuaires où l'eau est moins salée, moins claire et moins agitée (Songy et Avezard, 1963). On les retrouve aussi dans les ports. La nourriture des moules est très diverse elle est à base de diatomées, dinoflagellés, bactéries, flagellés, protozoaires, diverses spores, fragments d'algues

et de débris inorganiques (Lubet et Aloui, 1987). La nutrition est un paramètre important dans la répartition des moules qui prolifèrent généralement dans les zones riches en phytoplancton, en matières organiques dissoutes ou en suspension et en bactéries (Lubet, 1973). L'eau contenant ces éléments est filtrée à travers les branchies (deux paires de feuillets hémibranchiaux) qui grâce aux battements de leurs cils, acheminent ainsi les particules englobées de mucus vers les palpes labiaux qui les prennent en charge vers la bouche et le tube digestif.

IV.1.3 Anatomie et physiologie

Les moules contiennent deux valves lisses ou coquilles extérieures protectrices, ces coquilles sont sous forme subconique de couleur noire bleuâtre et sont maintenues ensemble par une petite charnière droite. Elles possèdent deux muscles adducteurs inégaux qui leurs permettent d'ouvrir et de fermer leur coquille. La moule se déplace lentement à l'aide de son pied pour trouver le meilleur emplacement de fixation. Le byssus est un faisceau de filaments soyeux sécrétés par une glande située au dessous du pied, il permet la fixation de la moule sur un support (Figure I.27).

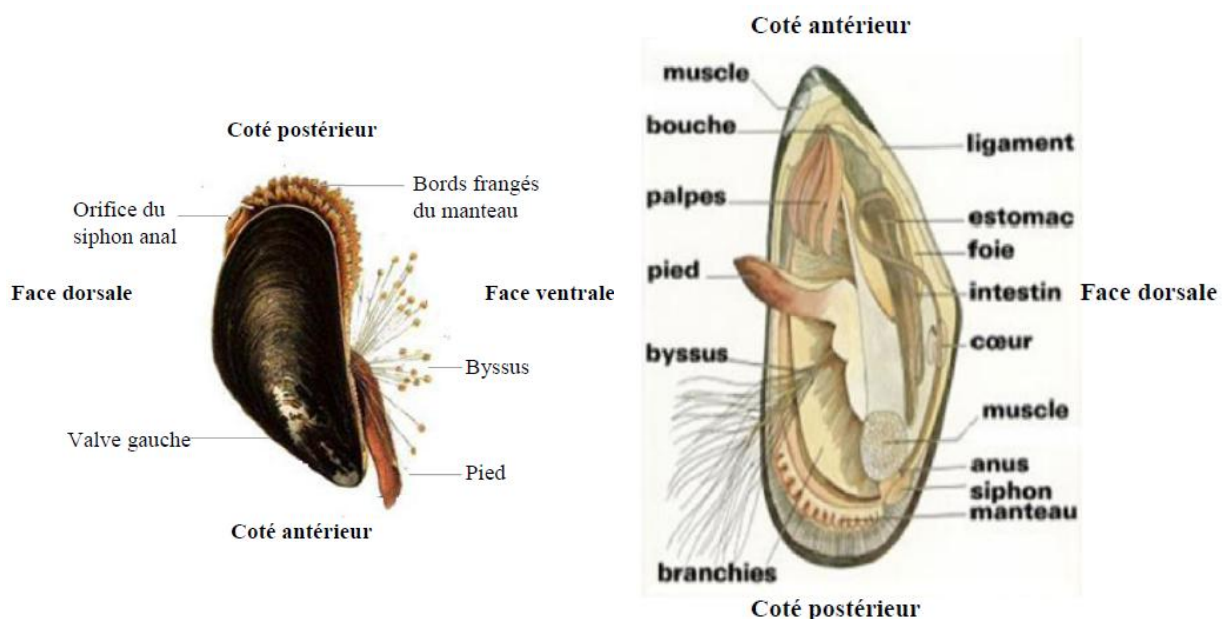


Figure I.27 Anatomie interne et externe de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Khelil, 2007; CRC, 2010).

La croissance des moules dépend de plusieurs paramètres biotiques et/ou abiotiques. L'étude biométrique de Lubet (1973) a montré que la croissance de *M. galloprovincialis* varie

selon les biotopes et les conditions physico-chimiques du milieu, et selon la densité de la population qui augmente beaucoup dans les zones soumises aux influences océaniques.

La respiration chez les moules se fait par l'intermédiaire des branchies. L'eau chargée en oxygène dissous pénètre dans la cavité palléale via le siphon. Elle est filtrée par les filaments des deux paires de branchies lamelleuses avant d'être évacuée par le courant exhalant (Figure I.28).

La fécondation chez les moules est externe et a lieu en pleine eau. Le développement embryon-larvaire se déroule en pleine eau (larve véligère pélagique) dans la zone littorale. A la suite de la métamorphose, les larves tombent sur le fond et s'y fixent. Leur fixation a lieu souvent sur des algues filamenteuses et les enrochements. La période de reproduction des moules n'est pas synchronique et varie de la fin du printemps jusqu'à la fin d'automne. Elle est liée à plusieurs facteurs dont la température et l'abondance de la nutrition.

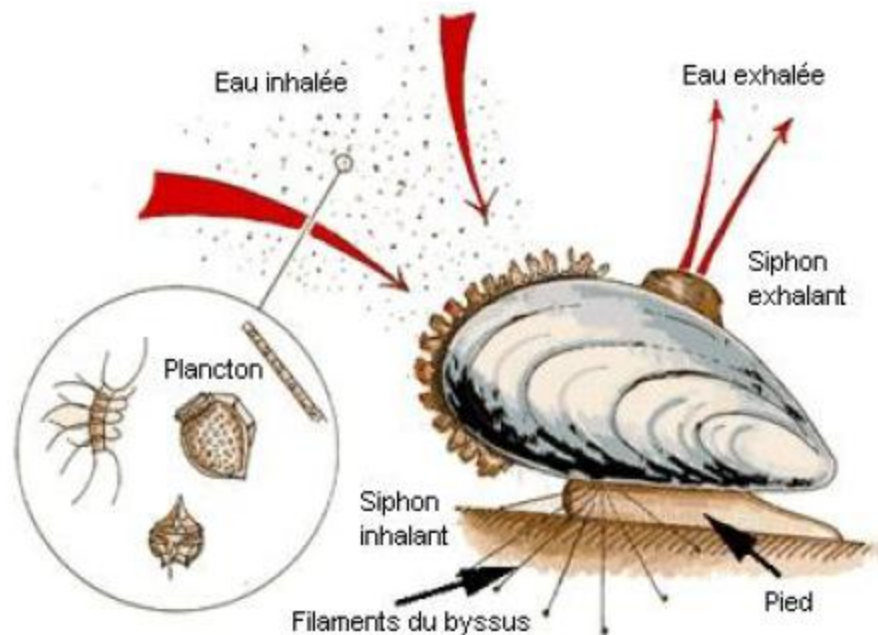


Figure I.28 Système respiratoire chez la moule (MPO, 2003).

IV.1.4 Utilisation en tant qu'espèce sentinelle

M. galloprovincialis est un modèle biologique très utilisé en écotoxicologie aquatique (Cappello et al., 2013; Libralato et al., 2013; Paredes et al., 2013). Il répond aux critères d'un bon bioindicateur de pollution: il est très abondant, sédentaire, sessile, ubiquiste, de collecte facile, transplantable, capable d'accumuler et de tolérer de fortes concentrations de polluants et fluctuations physico-chimiques de l'environnement (température, salinité, contaminants chimiques, etc.) (Cossa, 1985; Goldberg, 1986; Lopez-Barea et Pueyo, 1998).

IV.2 Le poisson Gobie *Zosterisessor ophiocephalus*

IV.2.1 Répartition géographique et systématique

Il s'agit d'une espèce endémique de la Méditerranée dont la distribution est principalement limitée à la mer Adriatique supérieure (nord), la mer Noire et la mer d'Azov (Miller, 1986). Cette espèce se rencontre aussi en mer Egée et dans le golfe de Tarente, en mer Ionienne (Tortonese, 1975). Il colonise les estuaires, les lagunes et les eaux marines côtières (Bauchot, 1987) jusqu'à 100 m de profondeur sur les côtes tunisiennes (Azouz, 1974). En Tunisie, *Z. ophiocephalus* a été signalé aussi bien au nord qu'au sud du pays (Azouz, 1974; Zaouali, 1993; Chaouachi et Ben Hassine, 1998; Menif, 2000). Il est également présent dans les lagunes de l'Ichkeul (Chaouachi et Ben Hassine, 1998; Menif, 2000); de Ghar El Melh (Ach-Ben Fadhel, 1995; Menif, 2000), de Bizerte, de Tunis, et d'El Bibène (Menif, 2000).

Zosterisessor ophiocephalus (Pallas, 1811) est une espèce de poissons téléostéens appartenant à la famille de Gobiidés. Elle est désignée par: Grass goby en Angleterre, Gobio serpenton en Espagne, Gobie lote en France et Ghiozzo go en Italie. En Tunisie, on le nomme Guebben ou Zankour (Chaouachi et Ben Hassine, 2001).

La classification de *Zosterisessor ophiocephalus* s'établit comme suit :

Règne: Animal

Phylum: Cordés

Sous-phylum: vertébrés

Classe: Ostéichthyens

Ordre: Perciformes

Famille: Gobiidés

Genre: *Zosterisessor*

Espèce: *Zosterisessor ophiocephalus*

IV.2.2 Ecologie

Z. ophiocephalus est une espèce de poisson démersal qui réside principalement dans les eaux saumâtres des estuaires et des lagunes. Ce poisson est également rencontré dans les substrats vaseux et dans les herbiers (Miller, 1986; Bauchot, 1987). Elle passe la plupart de son temps enfoui dans un terrier soigneusement creusé dans la vase, au milieu des herbiers de *Zostera* (Miller, 1986). *Z. ophiocephalus* se nourrit principalement de petits poissons (principalement athérines et gobies), de crustacés et de mollusques (De Casabianca et Kiener,

1969; Miller, 1986). Il se reproduit de février à mai en Tunisie (Menif, 2000) et de mars à juin en Italie (Franco et al., 2002b). La maturité sexuelle est atteinte à l'âge de 2 ou 3 ans (Miller, 1986) et la taille maximale est de 18 à 25 Cm (Berg, 1965) (Figure I.29). *Z. ophiocephalus* a une durée de vie de 3 à 5 ans (Miller, 1986).



Figure I.29 *Zosterisessor ophiocephalus* (présent travail).

IV.2.3 Espèce sentinelle du milieu marin

La relative ubiquité de ce poisson, associée à son mode de vie benthique et sédentaire permet d'envisager son utilisation dans des programmes de biosurveillance environnementale. De plus, un nombre croissant d'arguments concourent à positionner les Gobiidés comme une famille potentiellement intéressante dans les études écotoxicologiques et justifient le choix de ce modèle biologique. En effet, les gobies ont comme comportement de s'enfouir dans les sédiments. Ce contact intime avec les sédiments favorise une exposition directe aux contaminants pouvant être présents dans le substrat. De plus, ce sont des poissons relativement tolérants à la pollution, c'est pourquoi on les retrouve dans des sites où la pollution est importante (Louis, 2010). Des études ont déjà montré la pertinence de l'utilisation de cette famille dans les expérimentations écotoxicologiques (Livingstone et al., 1995; Franco et al, 2002a; Hajji et al., 2013).

IV.3 Le médaka japonais *Oryzias latipes*

IV.3.1 Biologie et écologie

Le médaka, *Oryzias latipes*, est un petit poisson d'eau douce présent à l'état sauvage essentiellement au Japon, mais aussi dans l'est de la Chine et en Corée. Il vit dans des eaux douces à saumâtres, en particulier dans les rizières, d'où son surnom de « japonese rice fish (poisson des rizières japonaises) » dans le monde anglophone (Wittbrodt et al., 2002).

Le médaka a été décrit pour la première fois scientifiquement sous le nom de *Poecilia latipes* dans l'ouvrage « *Fauna Japonica* » publié en 1850, écrit par le naturaliste hollandais

Phillip Franz von Siebold. En 1906, Jordan et Snyder renomment l'espèce *Oryzias latipes* d'après le nom scientifique du riz, *Oryza sativa*, les rizières étant le principal habitat du petit poisson (Wittbrodt et al., 2002).

Selon la classification systématique des poissons (Moyle et Cech, 2004), le médaka est un Téléostéen de la classe des Actinoptérygiens et de l'ordre des Béloniformes. Au sein de cet ordre, les Medakas appartiennent à la famille des Adrianichthyidae des poissons de rizières et au genre *Oryzias*, seul représentant de la sous-famille des Oryziinae. Le genre comprendrait près d'une vingtaine d'espèces différentes.

Le médaka est un poisson très résistant et robuste qui tolère de larges gammes de températures (10-40 °C) et de salinités (eau douce à saumâtre) bien qu'étant une espèce d'eau douce. Vivant en surface, il est microphage, c'est-à-dire qu'il se nourrit de phyto- et de zooplancton (Wittbrodt et al., 2002).

La reproduction du medaka est de type ovipare et s'étend de la mi-avril à la fin du mois de septembre au Japon (Iwamatsu, 2004). Un dimorphisme sexuel existe mais demeure discret: les mâles et les femelles peuvent être distingués par la forme de leur nageoire dorsale (Figure I.30).

L'activité sexuelle du medaka est corrélée aux cycles lumineux. L'accouplement ne peut être obtenu qu'après une période de lumière journalière supérieure à 13 heures, induisant la ponte des oeufs par la femelle et l'émission de sperme par le mâle. Après la ponte, les oeufs fécondés restent attachés par des filaments sous le ventre de la femelle. Entre 20 et 40 oeufs sont pondus chaque jour.

IV.3.2 Cycle de vie

Cette espèce se caractérise par un cycle de vie relativement court (Figure I.30). Son développement embryo-larvaire est relativement rapide (dizaine de jours à 26 °C) et a fait l'objet de nombreuses études aboutissant à une description détaillée (voir Iwamatsu, 2004; Gonzalez-Doncel et al., 2005). Ainsi, le développement embryo-larvaire est divisé en 39 stades suivi par 4 stades post-éclosion.

Les premières périodes fondamentales sont les suivantes: le stade unicellulaire, le zygote (0 hpf, suivi des premières divisions), le stade morula (4 h et 5 min pf), le stade blastula (6 h 30 min pf), le stade gastrula (13 h pf) et enfin le stade neurula (1 j et 1 h pf). Environ 2 h 30 plus tard, les premiers somites sont formés. Une ébauche du coeur (coeur tubulaire) est visible au bout d'1 j et 14 h (9 somites) et les premiers battements cardiaques débutent environ 6 h plus tard (16 somites). Le rudiment de la future nageoire pectorale est formé environ 2 j et 10

h pf (24 somites). 24 h plus tard, apparaissent les premiers vaisseaux sanguins. La formation des somites s'achève 4 j et 5 h pf. L'organogénèse du coeur est achevée au jour 6 pf et 24 h plus tard, c'est au tour de la cavité péricardique d'être mise en place. Au moment de l'éclosion, au jour 9 pf environ, les organes principaux des larves sont déjà formés et la suite du développement consistera principalement en une phase de grossissement, de développement et de différenciation des nageoires, la formation des dents et des écailles jusqu'à l'apparition des caractères sexuels secondaires marquant le début de la maturité sexuelle. Il est important de mentionner que le développement du Medaka est fortement influencé par la température et peut donc être aisément accéléré ou ralenti en jouant sur ce paramètre (Yamamoto, 1975).

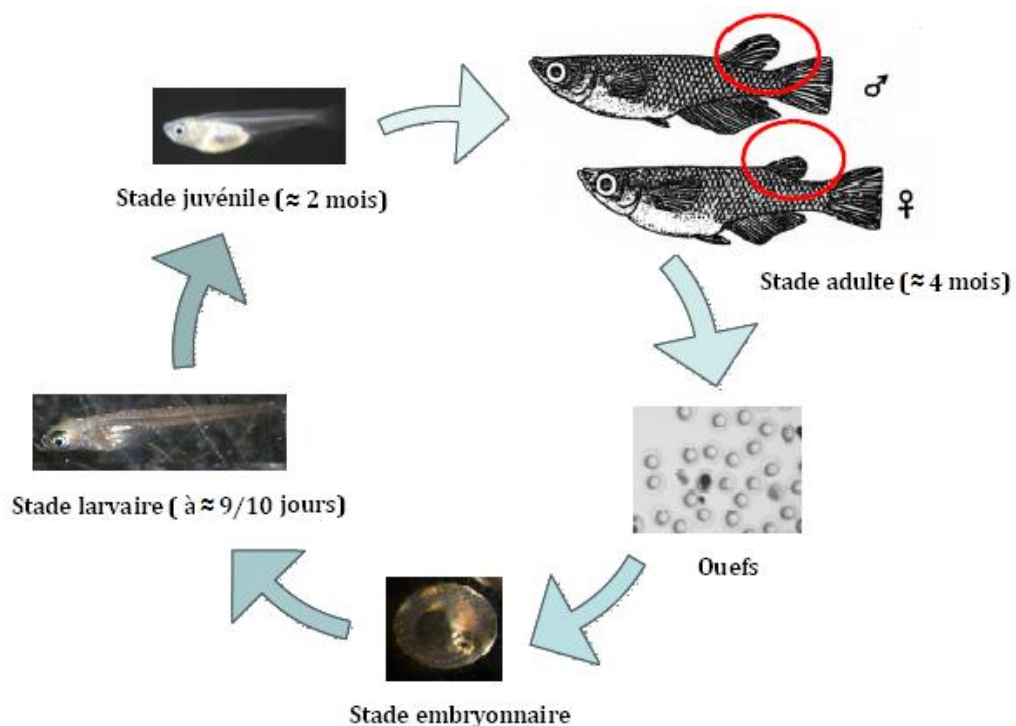


Figure I.30 Description de cycle de vie chez *Oryzias latipes*.

IV.3.3 Utilisation en tant qu'organisme modèle

Oryzias latipes est l'une des espèces de poisson dont l'utilisation a fait l'objet de nombreux études dans différents domaines comme par exemple, la mutagénèse, la génétique du développement, l'embryogénèse (notamment le développement de l'oeil et l'étude des cellules souches), la cancérogénèse, la toxicologie, l'étude de la reproduction... (Yamamoto, 1975; Wittbrodt et al., 2002; Shima et Mitani, 2004). En effet, cette espèce est aisément maintenue en stabulation dans les conditions d'un laboratoire, elle est peu exigeante vis-à-vis des caractéristiques de l'eau d'exposition (température, salinité, pH...), sa taille réduite et son

caractère grégaire concourent à son adéquation pour des expérimentations nécessitant un grand nombre d'individus. Son cycle de vie relativement court en fait également un modèle biologique de choix pour des études couvrant plusieurs générations dans le but d'obtenir des informations relatives aux conséquences populationnelles d'une exposition à un agent toxique (US EPA, 2002). De plus, il est important de mentionner que le génome de cette espèce a été récemment séquencé dans sa totalité (Shima et Mitami, 2004)

L'ensemble de ces qualités fait du Medaka japonais une espèce modèle préconisée dans les lignes directives de l'OCDE (1992a,b; 1998) et encourage l'utilisation de ce modèle et notamment les premiers stades de développement (SPD) dans le cadre d'études écotoxicologiques (Kim et Cooper, 1998; Patyna et al., 1999; Oshima et al., 2003; Cachot et al., 2007; Wu et al., 2008). Récemment, les SPD de Medaka japonais ont été utilisés pour évaluer les réponses toxiques engendrées par l'exposition à des sédiments contaminés artificiellement par des substances pures ou des mélanges environnementaux de contaminants (McElroy et al., 2006; Cachot et al., 2007; Vicquelin et al., 2011; Barjhoux et al., 2012).



CHAPITRE II

LES CONTAMINANTS ORGANIQUES DANS LA LAGUNE DE BIZERTE : NIVEAUX, SOURCES ET SIGNIFICATION TOXICOLOGIQUE PAR LES VALEURS GUIDES SÉDIMENTAIRES

Introduction

A Tunis, comme ailleurs, le développement industriel, agricole et urbain est accompagné inévitablement par des problèmes de pollution de l'environnement aquatique, où plusieurs milliers de substances chimiques sont déversées dans les eaux Tunisiennes et tendent à s'accumuler dans les sédiments. Parmi celles-ci, on recense des contaminants organiques majoritairement d'origine anthropique comme les HAP, les PCB et les pesticides organochlorés. L'impact de ces substances sur l'environnement est complexe, tant leurs actions toxiques peuvent être directes ou indirectes sur les individus, les populations ou les écosystèmes. La lagune de Bizerte, située à l'extrême nord de la Tunisie est l'un des exemples d'écosystèmes aquatiques qui souffre de divers problèmes de pollution.

Le chapitre 2 de cette étude qui est présenté sous la forme de deux articles s'inscrit dans le cadre d'une meilleure connaissance de l'état de la contamination (niveaux de contamination) des sédiments de surface de la lagune de Bizerte par les contaminants organiques décrits précédemment, déterminer les principales sources d'émissions, fournir la répartition spatiale et le bilan en contaminants organiques hydrophobes à l'échelle de la lagune de Bizerte. Cette étude a été menée à partir de prélèvements effectués dans 18 stations en mars 2011. La stratégie d'échantillonnage a été déterminée de façon à obtenir une bonne couverture spatiale de la surface de la lagune. Cette répartition des stations nous a permis de préciser les gradients de contamination le long de la lagune de Bizerte. Les HAP, PCB et pesticides organochlorés ont été déterminés dans tous les échantillons de sédiments prélevés. Les paramètres auxiliaires (granulométrie, carbone organique total, pH et salinité) ont également été déterminés dans les mêmes échantillons. Nous concluons ce chapitre par une évaluation de la toxicité potentielle de ces sédiments due aux contaminants mesurés grâce à l'utilisation de différentes valeurs guides sédimentaires.

II.1 Article 1: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from the Bizerte Lagoon, Tunisia: levels, sources and toxicological significance

Badreddine Barhoumi • Karyn LeMenach • Marie-Hélène Devier • Walid Ben Ameer • Henry Etcheber • Hélène Budzinski • Jérôme Cachot • Mohamed Ridha Driss

B. Barhoumi • W. B. Ameer • M. R. Driss

Laboratory of Environmental Analytical Chemistry (05/UR/12-03), University of Carthage, Faculty of Sciences of Bizerte, 7021 Zarzouna, Bizerte, Tunisia

B. Barhoumi • K. LeMenach • M. H. Devier • H. Budzinski • J. Cachot

University Bordeaux 1, CNRS, EPOC (UMR 5805), Laboratory of Physico- and Toxicology of the Environment (LPTC), 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France

H. Etcheber

University Bordeaux 1, CNRS, EPOC (UMR 5805), ECOBIOC, avenue des facultés, 33405 Talence Cedex, France

Environmental Monitoring and Assessment, 2014.

Abstract

To assess the status of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination in sediments from the Bizerte Lagoon (northern Tunisia), 18 surface sediment samples were collected in March 2011 and analyzed for 14 USEPA priority PAHs by high-performance liquid chromatography (HPLC). The total concentrations of the 14 PAHs (Σ PAHs) ranged from 16.9 to 394.1 ng g⁻¹ dry weight (dw) with a mean concentration of 85.5 ng g⁻¹ dw. Compared with other lagoons, coasts and bays in the world, the concentrations of PAHs in surface sediments of the Bizerte Lagoon are low to moderate. The PAHs' composition pattern was dominated by the presence of 4-ring PAHs (45.8%) followed by 5-ring (26.8%) and 3-ring PAHs (12.7%). The PAH source analysis suggested that the main origin of PAHs in the sediments of the lagoon were mainly from pyrolytic sources. According to the numerical effect-based sediment quality guidelines (SQGs) of the United States, the levels of PAHs in the Bizerte lagoon should not exert adverse biological effects. The total benzo[a]pyrene toxicity equivalent (TEQ) values calculated for the samples varied from 3.1 to 53.7 ng g⁻¹ dw with an average of 10.6 ng g⁻¹ dw.

Keywords Polycyclic aromatic hydrocarbons • Surface sediment • Bizerte Lagoon • Diagnostic ratios • Sediment Quality Guidelines

II.1.1 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) with two or more fused rings are an important class of persistent organic pollutants (POPs) and are ubiquitous in the environment. PAHs are introduced into the environment mainly via anthropogenic inputs and the biological conversion of biogenic precursors (Means et al. 1980). Anthropogenic input was regarded as the main source for the elevated concentration of PAHs in environmental matrices including fossil fuel combustion, refuse incineration, coal gasification and liquefaction processes, petroleum cracking, and the production of coke, carbon black, coal tar pitch, and asphalt (Countway et al. 2003). Industrial wastewater, sewage, road runoff/street dust and petroleum-related activities are other important sources of PAHs. A minor portion of PAHs also originates from discharges of non-combusted fossil fuel products (Bouloubassi and Salot 1991; Näf et al. 1992; Manoli et al. 2000). Because of their low solubility and high hydrophobicity, PAHs entering the aquatic environment preferentially adsorb onto particulates and finally accumulate in the sediments (Karickhoff 1981; Chiou et al. 1998). They are therefore considered a potentially dangerous group of chemicals and a threat to the environment and its bio-resources, especially those adjacent to major urban centers with high PAH inputs. The recognition of these facts prompted the US Environmental Protection Agency (USEPA) to include 16 PAHs within the priority pollutants list (Manoli et al. 2000). Due to their persistent, toxic, mutagenic, and carcinogenic characteristics (NRC 1983; Connel et al. 1997), the sources and distribution of PAHs have been the focus of numerous investigations in coastal/estuarine regions in industrialized countries in areas with anthropogenic impact all over the world (Kennicutt et al. 1994; Budzinski et al. 1997; Fernandes et al. 1997; Baumard et al. 1998a, 1998b; Zakaria et al. 2002; Hartmann et al. 2004; Cachot et al. 2006; Fang et al. 2007; Yan et al. 2009).

In the last few decades, progressive economic and demographic development at the vicinity of the Mediterranean coastline and lagoons has resulted in substantial changes taking place in northern Tunisia. Industrialization has increased, which results in that the lagoon basins and streams have unfortunately become open-dumping disposal sites, as was the case of the Bizerte Lagoon in Tunisia. In this area, several studies have investigated the application

of biochemical tools for pollution biomonitoring (Dellali et al. 2001b, 2004; Khessiba et al. 2001, 2005; Roméo et al. 2006; Mahmoud et al. 2010). However, little information is available on the sources and distribution of PAHs in surface sediments of Bizerte Lagoon (Mzoughi et al. 2002; Trabelsi and Driss 2005). In light of this data, our present work aims to: (1) investigate the spatial distribution of PAHs at a relatively large scale through the analysis of 18 surface sediment samples from the Bizerte Lagoon, (2) distinguish the possible sources of PAHs using diagnostic ratios of PAHs, and (3) assess the potential ecological risk of benthic organisms residing in this area.

II.1.2 Materials and methods

II.1.2.1 Study area

The Bizerte Lagoon is a Mediterranean lagoon located in the northern coast of Tunisia (latitude: 37°80'–37°14' N, longitude: 9°46'–9°56' E). It covers an area of 128 km² and has a mean depth of 7 m. It communicates, in the north, with the Mediterranean Sea by a 7 km long canal and in the south, with the Ichkeul lake by the Tinja river. The main tributaries of this lagoon are the rivers Tinja, Mrezig, Garek, Ben Hassine and Gueniche (Figure II.1.1). The lagoon is subjected to the influence of several physical factors that strongly fluctuate during the year. In winter, winds induce a vertical mixture of the water column, rains are strong and the freshwater flow coming from the Ichkeul Lake is important. On the other hand, in summer, inputs of seawater into the lagoon are important and the water column warming can induce its stratification (Sakka Hlaili et al. 2003). The human population around the lagoon is estimated at 163,000 inhabitants (2004 census) of which approximately 70% are concentrated in the city of Bizerte. The other main important towns bordering the lagoon are Menzel Bourguiba (which has a naval port and a metal factory), Menzel Abderrahman and Menzel Jemil. Some other industries (an iron and steel plant, a cement factory, and a refinery) are established nearby (Essid and Aissa 2002). The majority of these surrounding towns and industries discharge their waste into the lagoon. The exchange of water between the Mediterranean and the lake determine the salinity of the lagoon, which varies between 32.5‰ and 38.5‰. The water temperature range between 10 °C during winter (wet season) and 29 °C in summer time (dry season). The residence time of water bodies and contaminants in the Bizerte Lagoon is governed by several factors such as tide, wind, atmospheric pressure and temperature. A recent study, based on numerical modelling, was performed by Harzallah (2003) focusing on water and heat exchange between the lagoon and the Mediterranean Sea.

This model showed that the residence time of the contaminants is about 7 months. Actually, urban and industrial discharges in the Bizerte Lagoon take about 10 days to reach the canal entrance but several months to reach the Mediterranean Sea. This relatively high output time is due to the length of the canal which is about 7 km long.

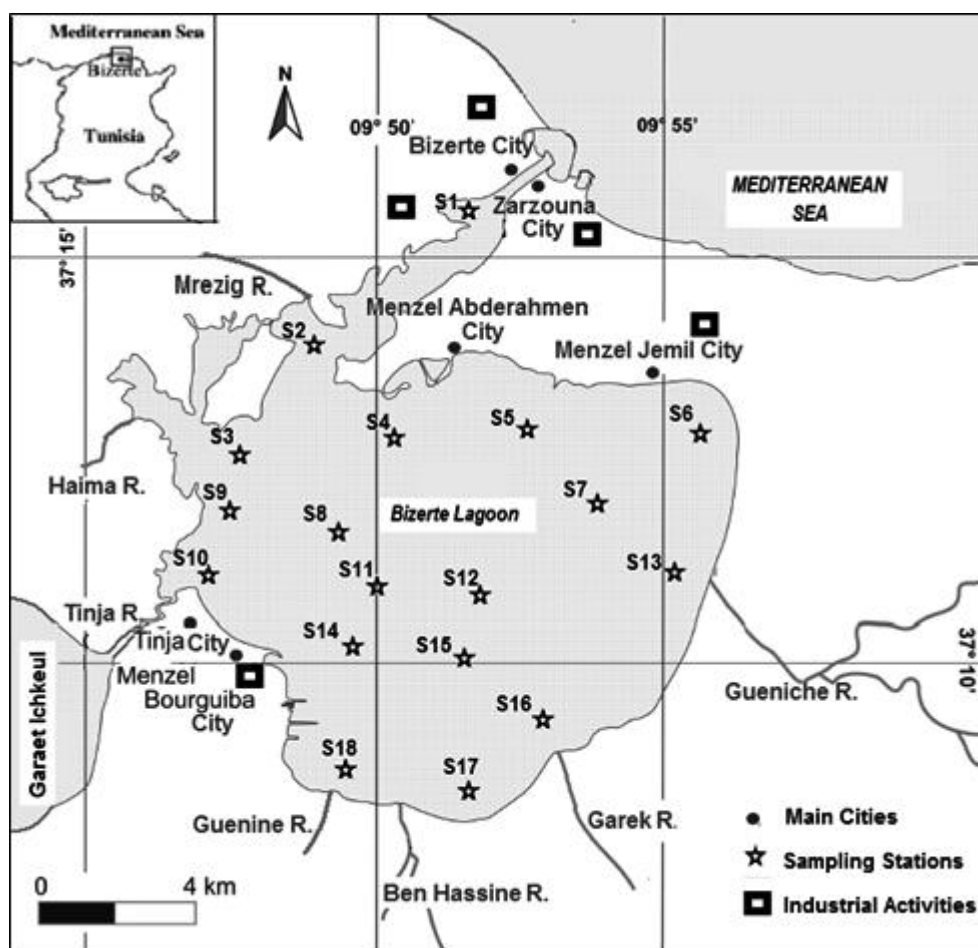


Figure II.1.1 Sampling locations in the Bizerte lagoon.

II.1.2.2 Sample collections, storage and preparation

Surface sediments were collected at 18 locations in March 2011 (Figure II.1.1). The selection of the sampling sites was based on different criteria related to the geomorphology of the lagoon, the hydrological regime and the localization of the urban and industrial discharges. Water depth at the sampling sites ranged from 2.5 to 12.1 m, with a mean value of 6.7 m. The top 0–10 cm of sediment were collected using a stainless steel grab sampler. Individual sediment samples were well mixed and immediately frozen at -20°C in pre-cleaned glass jars on board the boat used for sampling. In the laboratory, samples were defrosted and freeze-

dried, the sediments were then passed through a stainless steel sieve (2 mm mesh) and stored at 4°C until their analysis.

II.1.2.3 Chemicals

Standards (solids) of 14 USEPA priority PAHs [naphthalene (Nap), acenaphthene (Ace), fluorene (Fl), phenanthrene (Phe), anthracene (Ant), fluoranthene (Flu), pyrene (Pyr), benzo[a]anthracene (BaA), chrysene (Chr), benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF), benzo[a]pyrene (BaP), dibenzo[a,h]anthracene (DahA), and benzo[g,h,i]perylene (BgP)]; and a certified PAH standard mixture containing all 14 PAHs (PAH-Mix 45 at 10 µg mL⁻¹ in cyclohexane) were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA) and Dr. Ehrenstorfer (Germany), respectively. The purity of individual standards was higher than 96%. The first standard of PAHs was dissolved in acetonitrile (ACN) to prepare calibration solutions in the range 15-400 ng mL⁻¹ and the second solution was diluted with isooctane for the standard addition method. All solvents used for sample processing and analyses (dichloromethane (DCM) and acetonitrile) were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade and were purchased from Fisher (UK). The water used was from a MilliQ system (Milford, Mass, USA). Glass pearls (Roth) were used to fill the headspace of the pressurized fluids extraction cells (Dionex). A marine sediment certified reference material (EC-7, National Water Research Institute, Canada) was used in the evaluation of the analytical method.

II.1.2.4 Sample extraction

An ASE 200 accelerated solvent extractor (Dionex, France) with 22 mL extraction cells was used to perform the extraction of samples. Five grams of dry sediment were accurately weighed in to the stainless steel extraction cell that had been prefitted with a filter paper. The head space was filled with glass pearls. The cell was placed in the carousel and the extraction was carried out using DCM. The parameters used during the extraction procedure are listed in Table II.1.1. When the extraction was complete, the extract was completely evaporated under a gentle nitrogen stream and dissolved in 0.5 mL of acetonitrile. The final acetonitrile extracts were then filtered through a 0.45 µm PTFE syringe filter before being analyzed.

Table II.1.1 Accelerated solvent extraction (ASE) parameters

Parameters	Values
Temperature	100 °C
Pressure	100 bars
Static time	8min
Heat time	5min
Solvent	Dichloromethane (100%)
Cycle	2
Flush volume	60%
Purge time	60s

II.1.2.5 HPLC analysis

Quantitative analysis of PAHs was carried out using an analytical HPLC unit (Jasco, Japan) equipped with a Jasco PU-2089 HPLC pump, a type 7125 Rheodyne injector (with a 20 μL loop) and a fluorescence detector (FP-2020) with excitation and emission wavelengths that could be varied throughout the analysis. The optimized parameters of the fluorescence detector for the determination of each PAH compound are illustrated in Table II.1.2. Chromatographic separation and resolution was best achieved by using a Supelcosil LC-PAH (Supelco, Inc. Bellefonte, PA) reverse-phase C18 column (4.6 x 250 mm, 5 μm particle size) specific for PAH analysis. Data acquisition and processing was controlled by Chrom NAV (Jasco) software. The mobile phase was acetonitrile/water in gradient mode at a flow rate of 1.5 mL min^{-1} with the column thermostated at 22.0 ± 0.5 °C. The gradient elution program started with an initial mobile phase at 50:50 ACN:water (v/v), changing linearly to 100% ACN in 20 min and, after 10 min, changing back to the initial phase (50:50). Total run time of an analysis was 40 min. The injection volume was 20 μL .

II.1.2.6 Quality assurance and quality control

PAHs were identified by comparison of their retention time with those of the authentic standards; quantification was accomplished by using the standard addition method from an average sample obtained from a mixture of all the samples analyzed. The method is described in detail elsewhere (Bader 1980). The principle is presented as follows: a calibration curve is obtained by the addition of a known amount of analytes to the unknown specimen. Serial concentrations of the analyte are added to the sample; the intensity measured is then plotted versus the concentration added. The intercept point of the regression line and the concentration axis equals the amount of analyte in the original sample. In this work, the standard addition graph for all PAHs in sediments extracted was linear in the concentration range 1.97–28.75 ng mL^{-1} ($r^2 > 0.99$).

To perform the quality control, procedural blanks were analyzed and any analyte of interest was detected. The external standard multipoint calibration technique (in the range 15–400 ng mL⁻¹) was used to determine the linear response interval of the detector and in all cases, regression coefficients were higher than 0.996 for all the analytes. Detection limits (LOD, signal-to-noise ratio greater than three) and quantification limits (LOQ, estimated for a signal-to-noise ratio of 10) for each PAH, ranged from 0.01 to 0.54 ng mL⁻¹ and 0.04 to 4.65 ng g⁻¹ dry weight (dw), respectively. The whole analytical procedure was validated by analyzing the EC-7 certified reference material (CRM) from the National Water Research Institute (Canada). For all the studied PAHs, recoveries of higher than 80% were obtained for the CRM.

Table II.1.2 Optimized fluorescence conditions for PAHs determination.

PAH component	Abbreviation	Retention time (min) ^a	Excitation wavelength (nm)	Emission wavelength (nm)	Time (min)
Naphthalene	Nap	7.52	224	330	0–11.10
Acenaphthene	Ace	9.96	224	330	0–11.10
Fluorene	Fl	10.38	224	330	0–11.10
Phenanthrene	Phe	11.60	252	370	11.10–12.40
Anthracene	Ant	12.91	252	402	12.40–13.60
Fluoranthene	Flu	14.16	288	462	13.60–14.60
Pyrene	Pyr	15.20	238	398	14.60–17
Benzo[a]anthracene	BaA	18.55	252	402	17–20.40
Chrysene	Chr	19.58	252	402	17–20.40
Benzo[b]fluoranthene	BbF	22.16	290	430	20.40–25.55
Benzo[k]fluoranthene	BkF	23.75	290	430	20.40–25.55
Benzo[a]pyrene	BaP	25.10	290	430	20.40–25.55
Dibenzo[a,h]anthracene	DahA	27.86	300	420	25.55–32
Benzo[ghi]perylene	BgP	29.47	300	420	25.55–32

^a Retention time values may vary between 0.1 and 0.2 min

II.1.2.7 Other analyses

Total organic carbon (TOC) contents of sediments were determined by combustion in an LECO CS 125 analyzer (Etcheber et al. 2007). The dried and homogenized sediment samples were acidified in crucibles with 2N HCl to destroy carbonates, then dried at 60 °C to remove inorganic C and most of the remaining acid and water. The analyses were performed by direct combustion in an induction furnace, and the CO₂ formed was determined quantitatively by infrared absorption. TOC contents are expressed as a percentage of the dw of the sediment, abbreviated as TOC (%).

The percentage of finer grain size fractions ($\% < 63 \mu\text{m}$) of each sediment sample was determined gravimetrically after wet sieving (Savinov et al. 2000).

II.1.3 Results and discussion

II.1.3.1 PAHs concentrations

Surface sediments can reflect the current sediment contaminant status. All sediment samples ($n = 18$) of the Bizerte Lagoon contained detectable amounts of PAHs. The individual PAH concentrations (on a dry weight basis) were measured at each station. Table II.1.3 showed that Ace was only found in the sites S1, S2 and S5; DahA was not found in the sites S17 and S18. The other priority PAHs were found at most sampling sites. Indeed, the total concentration of 14 USEPA PAHs (ΣPAHs) in surface sediments varied from 16.9 to 394.1 $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$ with a mean concentration of 85.5 $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$. The largest amounts of PAHs were found along the channel (between the narrow part and the arsenal of Menzel Bourguiba), the path most frequented by boats. Maximum PAH levels were recorded in site S1 (394.1 $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$), followed by sites S2 (160.2 ng g^{-1}) and S9 (102.8 ng g^{-1}). Stations S1 and S2 are located along the channel connecting the lagoon with the Mediterranean Sea. This areas are highly populated and characterized by industrial activities including lead and cement manufacturing. In addition, S1 is located near the Bizerte Harbor where heavy traffic of tankers and commercial cargo boats is common. PAH inputs could also be attributed to the Merazig river and the incineration landfill located close to S2. In fact, the Merazig river, compared to the other rivers opening on the Bizerte Lagoon, receives the largest amounts of urban and industrial effluent discharges (Harzallah 2003). High concentrations of PAHs were also observed at station S9, probably due to the closeness of the mouth of the Tinja river which is affected by agricultural inputs. Site 4 is located near an urban area (Menzel Abderrahman city) and receives direct inputs of untreated urban sewage. S14 and S15 are located near the city of Menzel Bourguiba with intensive industrial activity: metallurgic industry, naval construction and tire production. In all the other stations, the PAH levels ranged from 16.9 $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$ to 73.3 $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$, with a mean value of 53.6 $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$. The highest concentration of 73.3 $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$ was recorded at S6, located near an urban and an industrial zone (Menzel Jemil city). However, the lowest concentration, 16.9 $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$, was found at S17. The geochemical composition ($\%\text{TOC}$) of this last site contributes to this observation. The distribution of PAHs in terms of the physical and chemical properties of sediments will be discussed later.

Table II.1.3 Concentrations of PAHs (ng g⁻¹ dw), percentage of total organic carbon (TOC) and percentage of finer grain size fractions (%<63 µm) in coastal superficial sediments of the Bizerte Lagoon.

Site	Nap	Ace	Fl	Phe	Ant	Flu	Pyr	BaA	Chr	BbF	BkF	BaP	DahA	BgP	ΣPAHs	TOC	%<63µm
S1	29.2	16.7	21.7	36.9	9.3	55.5	41.2	29.0	33.5	26.6	17.3	29.0	18.9	29.4	394.1	3.85	52.20
S2	11.3	1.8	2.4	12.4	2.2	22.8	21.9	14.3	20.5	16.1	8.9	13.8	3.4	8.5	160.2	0.68	11.32
S3	5.3	nd	2.3	6.0	1.3	10.7	9.8	6.4	9.6	6.8	3.1	5.2	1.0	2.1	69.7	2.16	57.04
S4	5.9	nd	4.2	6.0	1.2	10.7	9.4	6.5	9.4	9.6	3.5	5.4	1.0	4.1	76.7	1.40	89.50
S5	6.2	1.4	2.0	3.7	0.7	6.9	6.7	4.7	6.7	7.8	2.9	4.7	1.0	5.3	60.8	0.79	50.12
S6	nd	nd	nd	4.1	0.6	13.7	14.7	6.8	7.5	8.2	3.5	8.2	0.9	5.2	73.3	1.49	32.60
S7	6.5	nd	nd	3.7	0.8	5.5	4.9	2.7	4.5	12.1	1.5	2.1	1.5	4.3	50.0	1.24	12.98
S8	5.5	nd	2.2	4.0	1.0	8.6	7.3	4.7	6.5	5.6	3.1	5.0	1.4	9.5	64.4	1.58	89.62
S9	7.3	nd	2.4	6.4	1.4	13.9	12.8	6.5	9.1	12.5	6.2	9.0	1.5	13.9	102.8	1.27	65.90
S10	4.6	nd	nd	4.0	0.6	5.2	4.7	3.7	5.0	4.2	1.8	2.0	0.3	3.7	39.7	1.89	69.28
S11	6.7	nd	2.3	4.1	1.0	6.9	6.2	4.2	6.1	6.9	3.2	4.3	0.9	4.9	57.5	1.06	90.24
S12	7.1	nd	2.0	3.8	0.9	5.7	5.3	3.6	5.5	5.8	2.6	3.5	1.5	4.9	49.2	1.01	87.84
S13	nd	nd	1.6	3.6	0.9	4.3	4.1	2.5	3.6	4.0	1.8	2.4	0.5	5.5	34.9	1.16	89.40
S14	nd	nd	2.0	7.3	1.8	11.3	9.9	5.8	6.9	8.8	4.2	6.0	3.3	12.3	79.4	1.27	91.50
S15	nd	nd	1.9	6.4	1.6	12.3	11.0	6.0	7.4	10.7	5.0	7.1	1.8	12.3	83.5	1.01	95.28
S16	nd	nd	1.8	5.6	1.7	10.9	10.0	6.5	8.7	6.7	3.8	6.4	3.2	6.0	70.8	1.11	85.08
S17	nd	nd	nd	1.4	0.5	2.6	2.4	2.2	3.5	1.8	0.9	1.6	nd	nd	16.9	0.44	15.88
S18	nd	nd	nd	5.7	1.4	7.6	6.9	4.8	7.5	9.2	3.4	4.6	nd	5.0	55.8	1.03	32.10

nd: not detected

The comparison of Σ PAHs concentrations with those carried out in other coastal areas is difficult due to the geological characteristics of the sampling areas, the number of samples taken and the number of PAH compounds analyzed in the different studies, which may not be the same. However, a general idea of the pollutant levels in other coastal areas could be useful. Baumard et al. (1998b) classified four pollution levels of sediment: low, 0–100 ng g⁻¹ dw; moderate, 100–1,000 ng g⁻¹; high, 1,000–5,000 ng g⁻¹; and very high, >5,000 ng g⁻¹. Compared to other coasts, bays and lagoons in the world, the pollution levels of the PAHs in all the sediment samples from the Bizerte Lagoon (16.9–394.1 ng g⁻¹ dw) are low to moderate (Table II.1.4).

Table II.1.4 Comparison of PAH concentrations (ng g⁻¹ dw) in sediments of other coasts, bays and lagoons in the world.

	Sites	Number of samples	Min - max	Pollution level	References
Tunisia	Bizerte Lagoon	18	16.9–394.1	Low to moderate	This study
	Bizerta Lagoon	10	83.3–447	Low to moderate	Trabelsi and Driss (2005)
	Bizerta Lagoon	6	2.5–209.1	Low to moderate	Louiz et al. (2008)
	Ghar El Melh Lagoon	12	39.59–655.28	Low to moderate	Ben Ameer et al. (2010)
	Jarzouna- Bizerte, Coastal area	8	13.84–115.60	Low to moderate	Zrafi-Nouira et al. (2008)
	Sfax–Kerkennah, Coastal area	15	113.2–10720	Low to very high	Zaghden et al. (2007)
Italy	Pialassa Baiona	13	3,032–87,150	High to very high	Guerra (2012)
	Venice lagoon	25	20±1–502±69	Low to moderate	Secco et al. (2005)
	Venice lagoon	51	20–3,087	Low to high	Zonta et al. (2007)
	Stagnone coastal lagoon	8	72–18,381	Low to very high	Culotta et al. (2006)
France	Thau Lagoon	15	59–7,679	Low to very high	Leaute (2008)
	Berre Lagoon	2	334–853	Low to moderate	Kanzari et al. (2012)
	Arcachon Bay	7	32–4120	Low to high	Baumard et al. (1998a)
Brazil	Patos Lagoon	18	37.7–11,780	Low to very high	Medeiros et al. (2005)
	Rodrigo de la Freita lagoon	-	405–11,734	Low to very high	Stefens et al. (2007)
Iceland	Skógalón and Skógar lagoons	13	6–309	Low to moderate	Geptner et al. (2006)
Mexico	Coastal lagoons	4	14.9–61	Low to moderate	Piazza et al. (2008)
	Todos Santos Bay	28	7.6–813	Low to moderate	Macias-Zamora et al. (2002)
China	Yuandang Lagoon	12	203.7–1,590.5	Low to high	Li et al. (2010)
	South China Sea	16	24.7–275	Low to moderate	Yang (2000)
	Daya Bay	14	42.5–158.2	Low to moderate	Yan et al. (2009)
	Kenting coast, Taiwan	5	0.20–493	Low to moderate	Cheng et al. (2011)
Benin	Cotonou lagoon	6	25.1–1,411	Low to high	Soclo et al. (2000)
Central Vietnam	Coastal lagoons	10	112–628	Low to moderate	Giuliani et al. (2008)
USA	Chesapeake Bay	7	0.56–180	Low to moderate	Foster and Wright (1988)
	San Francisco Bay	16	2,636–27,510	High to very high	Pereira et al. (1996)
Russia	White Sea	11	13–208	Low to moderate	Savinov et al. (2000)

The contaminant levels are those assigned by Baumard et al. (1998b): low, 0–100 ng g⁻¹; moderate, 100–1,000 ng g⁻¹; high, 1,000–5,000 ng g⁻¹; and very high, >5,000 ng g⁻¹

A comparison of the temporal of PAHs contamination in the Bizerte Lagoon with those in the past was also made to show a decrease of PAH concentrations (Table II.1.5). The Σ PAHs concentration in the present study were approximately three times lower than those in sediments collected in 2001 (Trabelsi and Driss 2005). The difference in pollutant levels may reflect differences in the sampling periods. Trabelsi and Driss collected sediments in December (winter period) while in the present study sediments were collected in March (beginning of the spring period). The higher concentration of PAHs in December could be attributed to three main factors including the increasing use of domestic heating systems, lower microbial degradation and photolytic decomposition during winter. The biodegradation of organic compounds is facilitated by the presence of environmental conditions which favor microorganism metabolic activity (Cerniglia 1993; Hinga 2003). Quan et al. (2009) demonstrated that the metabolic activity of microorganisms was inhibited at low temperatures. Furthermore, temperature could potentially affect the sorption rate of pollutants onto particle and organic matter (Wu and Gschwend 1986). When temperatures decrease, PAHs solubility subsequently decreases and conversely PAHs bioavailability and biodegradation decrease (Whitehouse 1984; Eriksson et al. 2003). During summer time increasing temperatures and light intensity may favor biodegradation and photodegradation of PAHs. Interestingly, several PAH degrading bacterial strains were recently isolated from Bizerta lagoon sediments (Ben Said et al. 2008), which demonstrated the high PAH biodegradation capabilities of sediment microflora in this lagoon. As shown in Table II.1.5, the Σ PAHs concentration is only slightly different between 2006 (Louiz et al. 2008) and 2011 (this study), indicating that the net balance between the input and the degradation of PAHs have not changed significantly over this time period.

Indeed, there are many other factors affecting temporal variations of PAH levels in sediments, such as the physical and chemical characteristics of the PAH, the composition and chemical characteristics of the sediment, the depositional patterns and the partitioning processes.

Table II.1.5 The annual mean concentrations (ng g⁻¹ dw) of individual PAHs in the sediments of the Bizerte lagoon.

Year	Nap	Ace	Fl	Phe	Ant	Flu	Pyr	BaA	Chr	BbF	BkF	BaP	DahA	BgP	Σ PAHs
2001	4.5	0.9	0.8	22.7	9.8	33.0	45.7	7.2	34.8	1.8	28.2	15.1	3.2	0.6	208.3
2006	0.1	0.1	0.3	7.0	2.0	21.2	16.4	2.8	1.8	5.2	2.1	3.5	0.1	4.8	67.4
2011	5.1	1.1	2.7	6.9	1.6	11.9	10.5	6.7	9.0	9.1	4.3	6.7	2.3	7.6	85.5

The data presented in bold are the sum of the annual mean concentrations of individual PAHs

II.1.3.2 Sediment Geochemistry and PAH Accumulation

Total organic carbon (TOC) and fine fraction percentages in surface sediments from the Bizerte Lagoon ranged from 0.44 to 3.85% and from 11.32 to 95.28%, respectively (Table II.1.3). The S1 and S3 stations showed the highest content of TOC: 3.85% and 2.16%, respectively. The high levels of organic carbon recorded at these two stations are related to the high occurrence of urban and industrial wastewater discharges, which are rich in organic matter. For grain-size analysis, with the exception of stations S2, S6, S17 and S18 that show a predominantly sand composition, all other stations were composed of particles below 63 μm in size. Station S2 is located near a naval base and a solid waste landfill. Stations S6, S17 and S18 are located near the lagoon bank in an area characterized by sandy sediments (Mouldi et al. 2008). The abundance of fine particles was assumed to come from anthropogenic inputs associated with the erosion of surrounding agricultural areas (Ben Hassine river, Garek river, Gueniche river, Tinja river, Merazig river). This result was consistent with the findings of Mouldi et al. (2008) and Boufahja (2010) who showed that the surface sediments of the Bizerte Lagoon are mostly composed of silt and clay fractions.

It is generally stated that the environmental fate and behavior of hydrophobic organic compounds are ultimately determined by the physicochemical properties of both compound and sediments, namely, sediment organic matter content, size particle distribution, PAHs octanol–water partition coefficients (K_{ow}), and water salinity (Baker et al. 1991; Doong and Lin 2004). Previous studies have indicated that sediments with high organic carbon content generally contained high PAH concentrations. On the contrary, the sediments with low organic carbon content generally had low levels of PAHs. Furthermore, PAHs are mainly adsorbed onto fine particles (clay) because of their higher specific surface area (Xia and Wang 2008). In the present study data from stations S1 and S17 is distinguished from the others, and were excluded of the data set. Indeed, the highest and the lowest PAH concentration in these sites correspond to the highest and the lowest TOC content, respectively (Table II.1.3). Regression analysis was carried out to investigate the relationship between the concentration of ΣPAHs and the percentage of TOC and fine fraction. No significant correlation was found between $\Sigma 14\text{PAHs}$ and %TOC ($r=-0.330$, $p=0.212$, $n=16$). This suggests that distribution and concentrations of PAHs are more influenced by direct inputs rather than by organic matter content in the sediments. Several other studies reported similar results indicating no significant correlation between PAHs and %TOC (Mostafa et al. 2009; Arias et al. 2010). Simpson et al. (1996) suggested that PAH concentrations and OC content in sediments are

significantly correlated only for highly contaminated sites where total PAH concentrations exceed $2,000 \text{ ng g}^{-1}$. In the present study, total PAH concentrations of all sampled sediments did not exceed $2,000 \text{ ng g}^{-1}$ (Table II.1.3). Hence, it can be concluded that the distributions and concentrations of PAHs in sediments of the Bizerte Lagoon are not controlled by the sediment OC content. In our study, the homogeneity of the grain size composition between sediments made any correlation analysis between fine fraction and PAH concentrations difficult.

Although PAHs and TOC were correlated fairly well for the highly contaminated site (S1), it cannot be assumed that the observed positive correlation represents preferential partitioning of PAHs onto sediment according to the TOC percentages. As shows in Table II.1.3, in most of the studied locations of the Bizerte Lagoon, high PAH concentrations are not associated with high TOC and fine particulate contents. These preliminary results reveal a complex relationship between PAH concentrations in sediments and some physicochemical parameters of sediments of the Bizerte Lagoon, thus, suggesting involvement of other factors such as sources, transport, mixing, and deposition (Mai et al. 2005).

II.1.3.3 PAHs composition

According to the number of aromatic rings, the 14 PAHs were divided into five groups representing two-ring, three-ring, four-ring, five-ring, and six-ring PAHs. The relative concentrations of PAHs by aromatic groups in surface sediments from the Bizerte Lagoon are shown in Figure II.1.2. As illustrated, four-ring PAHs (46% of total PAHs, on average) were the most abundant followed by five-ring PAHs which accounted for 27% of the total PAHs. Two-ring, three-ring and six-ring PAHs accounted for about 5%, 13% and 9% of the total PAHs, respectively. Similar contributions of four-ring PAHs (49–56%) were found in the same region in 2001 and 2006 by Trabelsi and Driss (2005) and Louiz et al. (2008), respectively (Figure II.1.3).

In general, high-molecular-weight (HMW) four-ring to six-ring PAHs were prevalent (82%) in the Bizerte Lagoon sediments. Usually, HMW PAHs predominated in sediment samples. The low-molecular-weight (LMW) two-ring and three-ring PAHs, such as Nap, Ant, and Phe, are more labile and are expected to degrade faster than larger ones (Fernandes et al. 1997; Macias-Zamora et al. 2002). The higher concentration of HMW PAHs compared to those of LMW PAHs has been commonly observed in sediments from rivers, lagoons and marine environments (Culotta et al. 2006; Berto et al. 2009; Mostafa et al. 2009). The sources of PAHs will be further discussed with other evidence in the following section.

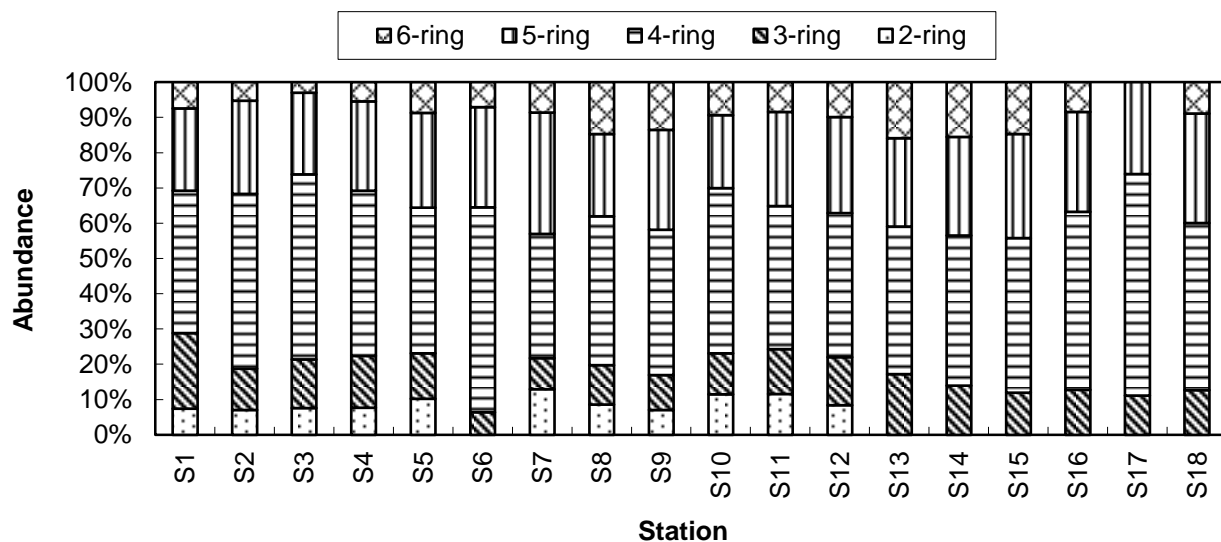


Figure II.1.2 Relative concentrations of PAHs by aromatic groups in sediments from the Bizerte Lagoon.

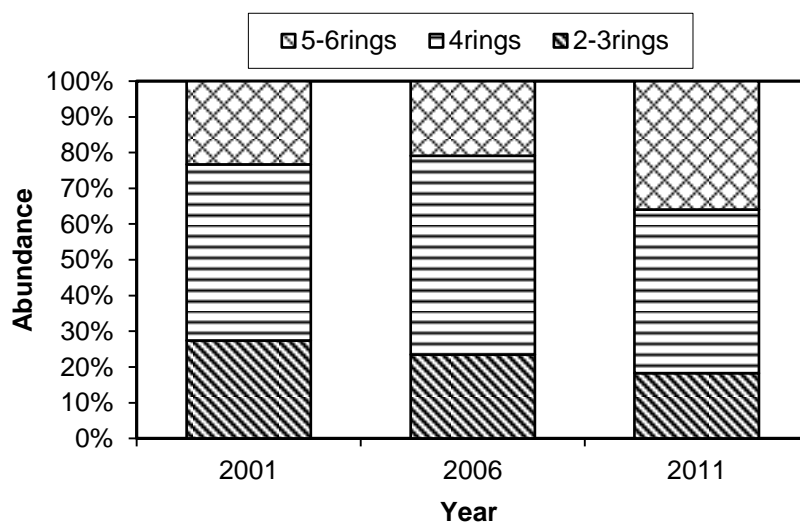


Figure II.1.3 Relative abundance of each grouped PAHs (%) in different time span.

II.1.3.4 Sources of PAHs

Table II.1.6 shows correlation (Spearman's) values among the 14 individual PAHs and Σ PAHs. All PAHs (except Nap, Fl and BgP) show a good to very good correlation ($r = 0.601-0.969$) with the Σ PAHs values. Such result suggests that the compositions of the major PAHs are fairly constant at different sampling sites and may come from similar sources.

Table II.1.6 Spearman's rank correlation coefficients (r) for sediment individual PAHs and the sum of PAHs (Σ PAHs) (n = 16).

	Nap	Ace	Fl	Phe	Ant	Flu	Pyr	BaA	Chr	BbF	BkF	BaP	DahA	BgP
Ace	0.560 <i>0.024</i>													
Fl	0.373 <i>0.155</i>	0.193 <i>0.473</i>												
Phe	0.342 <i>0.195</i>	0.541 0.030	0.347 <i>0.188</i>											
Ant	0.036 <i>0.894</i>	0.276 <i>0.300</i>	0.384 <i>0.142</i>	0.877 <0.001										
Flu	0.317 <i>0.231</i>	0.497 0.050	0.316 <i>0.233</i>	0.878 <0.001	0.718 0.002									
Pyr	0.289 <i>0.278</i>	0.515 0.041	0.243 <i>0.365</i>	0.839 <0.001	0.654 0.006	0.991 <0.001								
BaA	0.410 <i>0.115</i>	0.634 0.008	0.336 <i>0.202</i>	0.914 <0.001	0.713 0.002	0.960 <0.001	0.953 <0.001							
Chr	0.521 0.038	0.682 0.004	0.371 <i>0.157</i>	0.921 <0.001	0.704 0.002	0.904 <0.001	0.890 <0.001	0.978 <0.001						
BbF	0.456 <i>0.075</i>	0.481 <i>0.059</i>	0.142 <i>0.600</i>	0.732 <0.001	0.575 0.020	0.738 0.001	0.719 0.002	0.689 0.003	0.706 0.002					
BkF	0.373 <i>0.155</i>	0.546 0.029	0.378 <i>0.148</i>	0.907 <0.001	0.801 <0.001	0.929 <0.001	0.902 <0.001	0.905 <0.001	0.885 <0.001	0.766 0.001				
BaP	0.304 <i>0.251</i>	0.545 0.029	0.306 <i>0.248</i>	0.838 <0.001	0.698 0.003	0.978 <0.001	0.978 <0.001	0.938 <0.001	0.884 <0.001	0.725 0.001	0.954 <0.001			
DahA	0.102 <i>0.704</i>	0.335 <i>0.203</i>	0.321 <i>0.225</i>	0.652 0.006	0.742 0.001	0.632 0.009	0.586 0.017	0.600 0.014	0.533 0.033	0.461 <i>0.072</i>	0.611 0.012	0.597 0.014		
BgP	-0.053 <i>0.843</i>	0.037 <i>0.889</i>	0.227 <i>0.397</i>	0.403 <i>0.122</i>	0.535 0.033	0.451 <i>0.079</i>	0.397 <i>0.128</i>	0.272 <i>0.308</i>	0.194 <i>0.471</i>	0.421 <i>0.104</i>	0.591 0.016	0.497 0.050	0.504 0.046	
Σ PAHs	0.472 <i>0.065</i>	0.601 0.014	0.394 <i>0.131</i>	0.918 <0.001	0.751 0.001	0.967 <0.001	0.943 <0.001	0.952 <0.001	0.934 <0.001	0.813 <0.001	0.969 <0.001	0.960 <0.001	0.651 0.006	0.495 <i>0.051</i>

For each parameter, the Spearman's correlation coefficient is indicated in normal characters and the P-value is in italics. Data are bolded when the correlation is significant ($P < 0.05$)

PAHs are introduced into the environment mainly via industrial discharge, fossil fuel combustion, petroleum spills, and automobile exhausts, as well as through nonpoint sources, such as urban runoff and atmospheric fallout (Countway et al. 2003; Liu et al. 2008).

Identifying the possible sources of PAHs is very important to understand the fate of PAHs in the environment. The PAHs' congener distribution varied with the source as well as the composition and combustion temperature of the organic material. Molecular indices based on ratios of selected PAHs may be used to differentiate PAHs from pyrogenic and petrogenic origins. Pyrogenic sources (combustion processes) are enriched in HMW PAHs, whereas Petrogenic sources, such as the releasing of fuel oil or light refined petroleum products, are dominated by LMW PAHs. Thus, the LMW PAHs/HMW PAHs (LMW/ HMW) ratio may be used to determine the petrogenic and pyrogenic sources of PAHs in sediments (Budzinski et al. 1997; Soclo et al. 2000; Rocher et al. 2004). LMW/HMW ratio values which are lower than 1, indicate pyrolytic origin pollution, while ratio values higher than 1, indicate that the contaminations are mainly controlled by petrogenic PAHs (Soclo et al. 2000). To estimate the origin of the PAHs in sediment samples from the Bizerte Lagoon, the LMW/HMW ratios were determined and the results were listed in Table II.1.7. LMW/ HMW ratios at all sampling sites were lower than one (<1) suggesting the predominance of pyrolytic origin. In addition, ratios of specific PAH compounds including Phe/Ant, Flu/Pyr, Chr/BaA, Ant/(Ant+Phe), BaA/(BaA+Chr) and Flu/(Flu+Pyr) were also used to differentiate PAHs from pyrogenic and petrogenic origins (Budzinski et al. 1997; Zeng and Vista 1997; Baumard et al. 1998a; Yunker et al. 2002; Doong and Lin 2004; Liu et al. 2008) were also determined in this study. Table II.1.7 showed that all of the Phe/Ant values were lower than 10 and all of the Flu/Pyr values were higher than 1, indicating that pyrogenic inputs could be the main source of PAHs in surface sediments of the study area. The Chr/BaA ratios obtained ranged from 1.10 to 1.61, indicating a petrogenic source of contamination of the sediment. This index is based in part on the concentrations of Chr, however, in the literature, opinions on the sources of chrysene are divided. Rocher and Moilleron (2007) favored a pyrolytic origin, while Doong and Lin (2004) classified this PAH as the markers of petrogenic origin. The isomer pair ratios in our study, such as Ant/(Ant+Phe) and BaA/(BaA+Chr) ranged from 0.13 to 0.24 and from 0.38 to 0.48 respectively, indicating that the main origin of PAHs in sediments in this lagoon was from a pyrolytic source (Table II.1.7). Plots of isomeric ratios BaA/(BaA+Chr), and Ant/ (Ant+Phe) versus Flu/(Flu+Pyr) (Figure II.1.4) confirmed this predominant-source and showed that the pyrogenic PAHs originated from the incomplete combustion of coal, grass or wood, for all the samples, except S6 that had the combustion of

petroleum as a source. This station is located close to the motorway, in front of the municipal draining discharge for the city of Menzel Jemil that is a highly urbanized region. Thus, the hypothesis of a contamination by the road at this station is likely, but remains to be confirmed.

Predominance of pyrolytic PAHs in the studied area could be explained by the high number of factories using coal as a fuel. In fact, since the 1950s, about one hundred industries settled in the vicinity of the lagoon, the most important being the cement factory (1950) and the steel complex "El Fouledh" (1965). These industrial units are responsible for various pollutant discharges reaching the sediments as a result of atmospheric deposition and urban runoff (Stout et al. 2004; Van Metre and Mahler 2005). Altogether industries generate a daily average flow of wastewater of about 31,600 m³/day in the Bizerte Lagoon. These wastewater discharges account for 3139 kg/day of PAH inputs into the lagoon. In addition, urban sources generate a daily average flow of wastewater of about 20,000 m³/day, which corresponds to 23.5 kg/day of hydrocarbons, while harbor activities provide only 0.11 kg/day of hydrocarbons (MAERH 2003). Open burning of biomass is a common procedure for crop and forest residue disposal and land preparation. Combustion by-products are transported to the marine environment by dry and/or wet depositions from the atmosphere (Wu et al. 2001). In addition, multiple other sources of PAHs such as transport, heating systems, waste incinerators, municipal waste etc., can explain the pyrolytic origin of the PAH contamination in the area. Dominance of pyrolytic PAHs in marine sediments has been found in most Mediterranean countries in the vicinity of industrialized or urbanized areas (Van Metre and Mahler 2005; Barra et al. 2009; Pietzsch et al. 2010; Viñas et al. 2010; Alebic-Juretic 2011; Hu et al. 2011; Hung et al. 2011; Perra et al. 2011). Despite the presence of an oil refinery in the vicinity of stations S1 and S2, petrogenic PAHs were not predominant in our work. This result agrees with the results obtained in the Galician coast (Franco et al. 2006) and in the case of the Erika accident (Tronczynsky et al. 2004).

Although distinct sources may be inferred from PAH isomer pair ratios, it is well-documented that the fingerprint of PAHs may be altered by biological (e.g. bacterial activity), chemical (e.g. oxidation and reduction) and/or physical (e.g. air mass mixing and sediment resuspension) processes during transport and after deposition in marine sediments (Tolosa et al. 1996). The importance of using a battery of different ratios is highlighted here; only considering the Chr/BaA ratio, the conclusion about the sources of PAHs would have been different. The ratios used, except this one, converge to the same conclusion: PAHs in surface sediments in the Bizerte Lagoon are mainly from pyrolytic sources.

Table II.1.7 Characteristic values of selected molecular ratios for pyrogenic and petrogenic origins of PAHs.

Ratio	Pyrolytic origin	Petrogenic origin	This study	References
Flu/Pyr	≥ 1	< 1	0.93–1.35	Doong and Lin (2004)
Phe/Ant	< 10	> 15	3.11–6.81	Budzinski et al. (1997)
Chr/BaA	< 1	> 1	1.10–1.61	Zeng and Vista (1997)
Ant/(Ant+Phe)	> 0.1	< 0.1	0.13–0.24	Liu et al. (2008)
BaA/(BaA+Chr)	> 0.35	< 0.20	0.38–0.48	Yunker et al. (2002)
Flu/(Flu+Pyr)	> 0.50	< 0.40	0.48–0.57	Yunker et al. (2002)
LMW/HMW	< 1	> 1	0.07–0.41	Soclo et al. (2000)

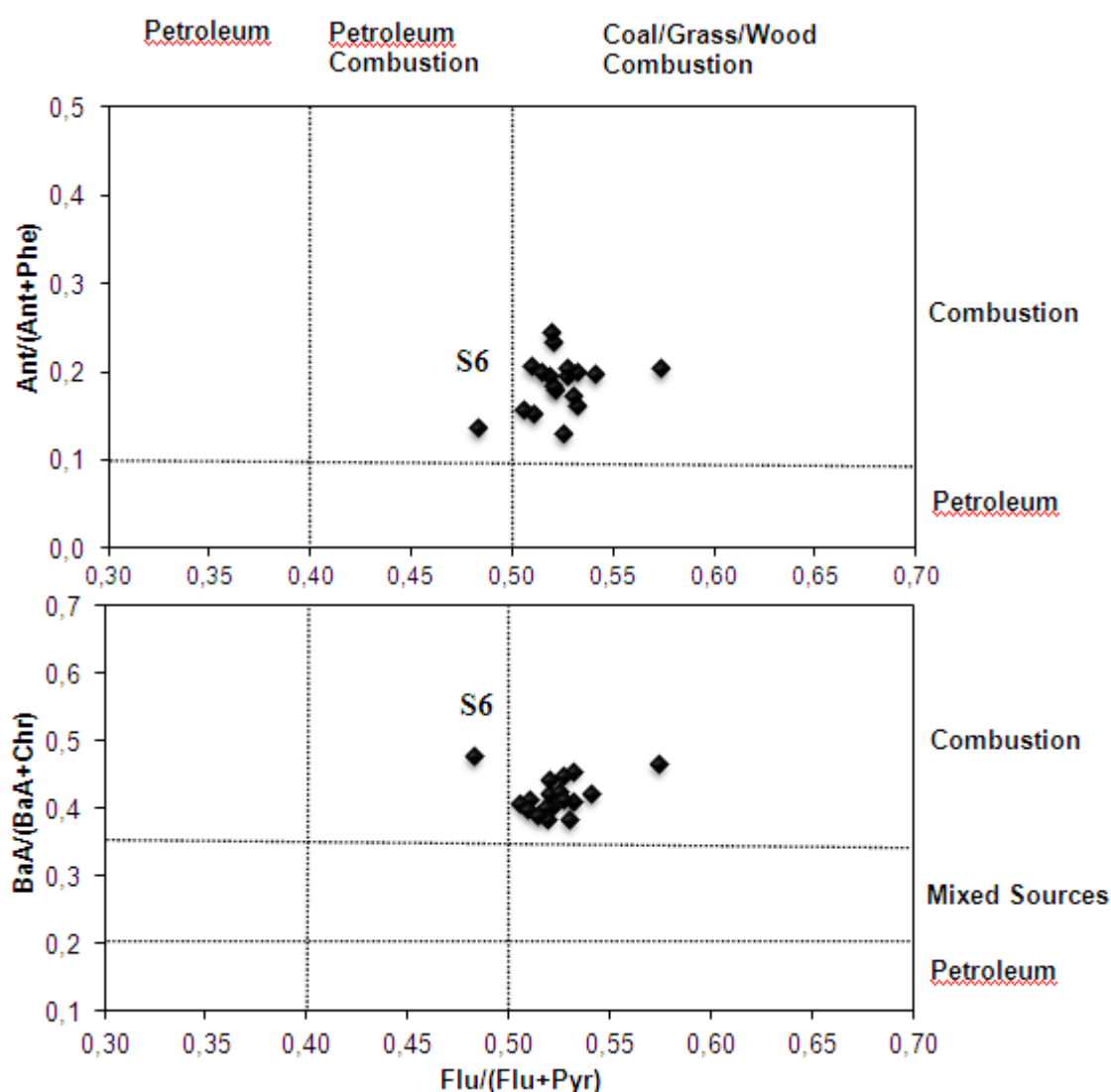


Figure II.1.4 Plots of isomeric ratios BaA/(BaA+Chr), and Ant/ (Ant+Phe) versus Flu/(Flu+Pyr).

II.1.3.5 Assessment of sediment quality and toxicity

PAHs are ubiquitously distributed in diverse environmental matrices such as soil and sediment, and deserve increasing attention due to their high stability, low solubility and toxic, carcinogenic and mutagenic effects. Sediment quality guidelines (SQGs) are useful tools for the assessment of contamination in marine and estuarine sediments (Long et al. 1995; Qiao et al. 2006; Quiroz et al. 2010). Long et al. (1995) developed two guideline values, an effects range low (ERL) and an effects range median (ERM), to assess the sediment quality using a ranking of low to high impact values. The measured concentrations of PAHs were compared with the ERL and ERM values (Table II.1.8). Results obtained in this study showed that the average total PAH concentrations at all sites were below the ERL and ERM. For individual components this result is also valid, except in the case of Ace and Fl (with a slightly higher concentration than the ERL value). Thus concentrations of PAHs found in this study are not expected to be a threat to benthic marine organisms along the Bizerte Lagoon.

Table II.1.8 Guideline values for PAH compounds in sediments (ng g⁻¹ dw).

PAHs Compound	SQG ^a		This study	
	ERL	ERM	Average	Maximum
Nap	160	2,100	8	29.2
Ace	16	500	7	16.7
Fl	19	540	4	21.7
Phe	240	1,500	7	36.9
Ant	853	1,100	2	9.3
Flu	600	5,100	12	55.5
Pyr	665	2,600	11	41.2
BaA	261	1,600	7	29.0
Chr	384	2,800	9	34.0
BbF	NA	NA	9	26.6
BkF	NA	NA	4	17.3
BaP	430	1,600	7	29.0
DahA	63.4	260	3	18.9
BgP	NA	NA	8	29.4
ΣPAHs	4,000	44,792	85.5	394.1

Some PAHs, and especially their metabolic products, are of great concern due to their documented carcinogenicity. These potentially carcinogenic PAHs (CPAHs) include BaA, BaP, BbF, BkF, DahA and InP (Savinov et al. 2003). The InP was not investigated in this

study. The total concentrations of CPAHs in sediments from the Bizerte lagoon varied from 6.6 to 120.8 ng g⁻¹ dw (with a mean concentration of 29.1 ng g⁻¹ dw) and accounted for 30.1–39.8% of the total PAH concentrations.

Among all the known potentially carcinogenic PAHs, BaP is the only PAH for which toxicological data is sufficient to derive a carcinogenic potency factor (Peters et al. 1999; Bowman et al. 2002). Toxic equivalence factors (TEFs) were applied to quantify the carcinogenicity of other PAHs relative to BaP and to estimate benzo(a)pyrene-equivalent doses (BaP_{eq} dose). Calculated TEFs for BaA, BaP, BbF, BkF, DahA, and Chr were 0.1, 1, 0.1, 0.01, 0.1, 1, and 0.001, respectively, according to the USEPA. In this study, we converted the above mentioned six PAH concentrations into one toxic concentration for each site using the corresponding TEFs. According to IARC (1987), the total toxic benzo(a)pyrene equivalent (TEQ) of all these PAHs is:

$$\text{BaP}_{\text{eq}} \text{ dose}_i = \text{TEF}_i \cdot \text{dose}_i$$

$$\text{Total TEQ} = \sum \text{BaP}_{\text{eq}} \text{ dose}_i$$

Total TEQ values calculated for samples from the Bizerte Lagoon varied from 3.1 to 53.7 ng g⁻¹ dw with a mean value of 10.6 ng g⁻¹. The maximum value of total TEQ was found at station S1 situated right next to the Bizerte commercial harbor indicating a local source of contamination. Mean values of relative BaP_{eq} doses in total TEQ, decreased in the following order: BaP (65.4%) > DahA (18.7%) > BbF (10.4%) > BaA (7%) > BkF (0.4%) > Chr (0.1%) (Figure II.1.5). Similar contributions of BaP (43.6–70%) were found in other studies in different environments (Savinov et al. 2003; Qiao et al. 2006; Ünlü et al. 2009), confirming the importance of using BaP as an indicator of carcinogenic PAHs in sediments.

In comparison to other studies, the total TEQ values in sediments of the Bizerte Lagoon were lower than the values detected in the Coastal lagoon, Northern Adriatic, Italy (Guerra 2012) and close to the ones found at the coastal lagoons in central Vietnam (Giuliani et al. 2008).

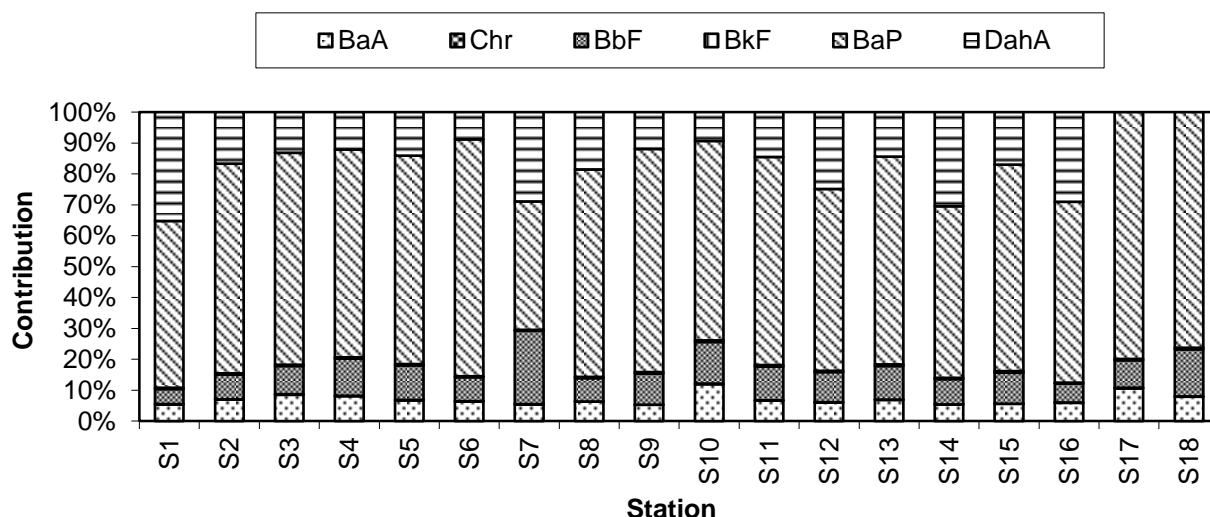


Figure II.1.5 Contributions of BaA, Chr, BbF, BkF, BaP and DahA to the total TEQ value at each station.

II.1.4 Conclusions

In the present study, analysis of surface sediment samples from 18 sites along the Bizerte Lagoon showed that the highest levels of PAHs were found at station S1. Four- to five-ring PAHs were predominant in sediments. Comparison of the concentration range with a worldwide survey of PAH concentrations in sediments ranked PAHs contamination in Bizerte Lagoon's sediments as poorly to moderately polluted. PAH source identification showed that grass, wood and coal combustion were the primary PAH sources in most sediments of the Bizerte Lagoon. The sediment quality guidelines assessed the surface sediment of the Bizerte Lagoon to be within minimal effect ranges for benthic organisms. To better understand the importance of organic matter and particle geochemistry in the distribution of PAHs in sediments, further detailed work is required. The results of this study would be helpful for understanding the levels, distribution, biological effects and sources of PAHs in Bizerte Lagoon sediments, which can provide information for protecting water resources and human health of lagoon and/or coastal areas in Tunisia.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Tunisia. The author would also like to thank the language expert Nayua Abdelkefi for proofreading the manuscript.

II.2 Article 2: Distribution and ecological risk of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in surface sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia

Badreddine Barhoumi • Karyn LeMenach • Marie-Hélène Dévier • Yassine El megdiche • Bechir Hammami • Walid Ben Ameer • Sihem Ben Hassine • Jérôme Cachot • Hélène Budzinski • Mohamed Ridha Driss

B. Barhoumi • Y. El megdiche • B. Hammami • W. Ben Ameer • S. B. Hassine • M. R. Driss
Laboratory of Environmental Analytical Chemistry (05/UR/12-03), University of Carthage,
Faculty of Sciences of Bizerte, 7021 Zarzouna, Bizerte, Tunisia

B. Barhoumi • K. LeMenach • M. H. Dévier • J. Cachot • H. Budzinski
University Bordeaux 1, CNRS, EPOC (UMR 5805), Laboratory of Physico- and Toxicology-
Chemistry of the Environment (LPTC), 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex,
France

Environmental Science and Pollution Research, 2013.

Abstract

Polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) were determined in 18 surface sediment samples collected from Bizerte lagoon, Tunisia. The total concentrations of 10 PCBs (Σ PCBs) and of four OCPs (Σ OCPs) in the sediments from this area ranged from 0.8 to 14.6 ng g⁻¹ dw (average value: 3.9 ng g⁻¹ dw) and from 1.1 to 14.0 ng g⁻¹ dw (average value: 3.3 ng g⁻¹ dw), respectively. Among the OCPs, the range of concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites (DDTs) and hexachlorobenzene (HCB) were 0.3–11.5 ng g⁻¹ dw (1.9 ng g⁻¹ dw) and 0.6–2.5 ng g⁻¹ dw (1.4 ng g⁻¹ dw), respectively. Compositional analyses of the POPs indicated that PCB 153, 138 and 180 were the predominant congeners accounting for 60% of the total PCBs. In addition, *p,p'*-DDT was found to be the dominant DDTs, demonstrating recent inputs in the environment. Compared with some other regions of the world, the Bizerte lagoon exhibited low levels of PCBs and moderate levels of HCB and DDTs. The high ratios Σ PCBs/ Σ DDTs indicated predominant industrial versus agricultural activities in this area. According to the established guidelines for sediment quality, the risk of adverse biological effects from such levels of OCPs and PCBs as

recorded at most of the study sites was insignificant. However, the higher concentrations in stations S1 and S3 could cause biological damage.

Keywords Organochlorine pesticides • Polychlorinated biphenyls • sediments • Distribution • Ecotoxicological assessment • Bizerte Lagoon • Tunisia

II.2.1 Introduction

Organochlorines (OCs), such as polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs), represent an important group of persistent organic pollutants (POPs) that have caused worldwide concern as toxic environmental contaminants. In 2001, the Stockholm Convention (UNEP 2001) on POPs was established as a global treaty to protect human health and the environment from these chemicals. Tunisia declared its accession to the Stockholm Convention in 2001 and became legally bound in 2004. Organochlorine compounds have been widespread used, with both industrial and agricultural sources contributing in significant amounts to inputs in the environment through leakage, disposal and evaporation. In aquatic environments, chlorinated compounds are removed from the water column and adsorbed onto particulate matter, and finally deposit to sediments which may play a role as secondary contamination sources. These pollutants can be bioaccumulated in sediment-dwelling organisms and then transferred to higher trophic levels through the food chain (Chau 2005). POPs accumulated in sediments represent secondary sources of contamination and a potent threat for aquatic ecosystem.

Although the applications of OCPs have been banned in many developed countries, some developing countries are still producing and using these persistent pesticides because of their low cost and versatility in controlling various insects (Monirith et al. 2003). OCPs chemicals were widely used in Tunisia from the end of 1940s to 1980s for insect control, sanitary purposes, and agricultural and building protection. Based on their harmful effects to wildlife and humans, use and import of many chlorinated compounds such as aldrin, endrin, chlordane, DDT, HCB and toxaphene were completely banned in Tunisia in 1984. However, old stockpiles of obsolete pesticides were identified in Tunisia in 1997 (APEK 2005). The stocks were estimated in 2003 at 84,000 L and 1,472 tons of OCPs spread all over the country in some 132 sites. Similarly, PCBs have been used in industry as heat exchange fluids in transformers and capacitors and as additives in pesticides, adhesives, dusting agents, cutting oils, flame retardants, heat transfer fluids, hydraulic lubricants, sealants, paints, caulk, and carbonless copy paper (Tolosa et al. 1997). In 1986, the import into Tunisia of transformers or

any equipment containing PCBs was banned. Moreover, the use of PCB-containing transformer oils after maintenance and repair was also prohibited. However, a large number of transformers containing PCBs are still used or presently stored in unsatisfactory conditions and therefore may represent a threat risks to human health and to the environment. This number continues to increase. In 2004, a preliminary study, identified 1,079 PCB contaminated transformers in Tunisia, representing 720 tons of liquid PCBs and 2,900 tons of contaminated equipments (APEK 2005). In spite of the fact that numerous countries withdrew the registered usage of OCPs many years ago, these manmade chemicals still persist at considerable levels worldwide (Hendy and Peake 1996; Sarkar et al. 1997). In many instances, derivatives of DDT, including DDE and DDD, have been detected in surface waters, in sediments and as suspended solids more than 25 years after DDT was prohibited (Hung and Thiemann 2002).

The Bizerte lagoon is a Mediterranean lagoon located in the northern coast of Tunisia (latitude, 37°80'–37°14'N; longitude, 9°46'–9°56'E). It covers an area of 128 km² and has a mean depth of 7 m. It communicates, in the North, with the Mediterranean Sea by a 7-km long canal and, in the South, with the Ichkeul Lake by the Tinja River. The principal tributaries of this lagoon are the Rivers Tinja, Mrezig, Garek, Ben Hassine and Gueniche (Figure. II.1.1). The lagoon is subjected to the influence of several physical factors strongly fluctuating during the year. In winter, winds induce a vertical mixture of the water column, rains are strong and the freshwater flow coming from the Ichkeul Lake is important. On the other hand, in summer, inputs of seawater in the lagoon are important as well as surface water warming which can lead to water column stratification (Sakka Hlaili et al. 2003). The human population around the lagoon is estimated at 163,000 inhabitants (census of 2004) of which approximately 70% are concentrated in Bizerte town. The other main important towns bordering the lagoon are Menzel Bourguiba (which has a naval port and a metal factory), Menzel Abderrahman and Menzel Jemil. Some other industries (an iron and steel plant, a cement factory and a refinery) are established nearby.

Many recent reports are available describing the distribution of PAHs and heavy metals in surface sediments from the Bizerte lagoon (Trabelsi and Driss 2005; Louiz et al. 2008; Garali et al. 2010) and application of biochemical tools for pollution biomonitoring (Khessiba et al. 2001, 2005; Mahmoud et al. 2010; Ben Ameur et al. 2012). However, little information is available on contamination by OCs in this area. The only data available on OC contamination in the Bizerte lagoon are based on accumulation of these pollutants in marine species (Ben Ameur et al. 2013b). To date, the distribution of PCBs in sediments from the Bizerte lagoon

has been only reported by Derouiche et al. (2004) and these data represent the first report on the levels of contamination by OCPs. Based on this, a comprehensive study is needed to reflect the overall distribution and ecological risk of POPs in sediments from the Bizerte lagoon, and to identify the sources of POPs. Hence, 18 surface sediment samples were collected in this study area. The reported concentrations of OCPs in Bizerte lagoon sediments provide a baseline for future research in environmental pollution of lagoons and/or coastal areas in Tunisia.

II.2.2 Materials and methods

II.2.2.1 Sampling

A total of 18 surface sediments samples (0–10 cm) located by GPS (Global positioning system) were collected with a stainless steel grab in March 2011. Details of the sampling sites are shown in Figure II.1.1 and Table II.2.1. Sites were selected to be representative of the different human activities, e.g. industries, refinery activities, urban activities (wastewater) and agriculture. After collection, samples were wrapped in aluminum foil and cool transported to the laboratory where they were immediately stored in a freezer. All sediment samples were freeze-dried, then sieved using a 2-mm mesh, homogenized and stored at 4 °C prior to analysis.

Table II.2.1 Sampling site locations and physicochemical characteristics of sediments from the Bizerte lagoon.

Station	Location		Depth (m)	TOC (%)	%<63µm	pH
	Latitude	Longitude				
S1	37°15.682'N	9°51.540'E	7.3	3.9	52.2	8.0
S2	37°13.905'N	9°49.491'E	2.5	0.7	11.3	6.8
S3	37°12.945'N	9°48.310'E	4.2	2.2	57.0	6.8
S4	37°12.920'N	9°50.460'E	12.1	1.4	89.5	7.4
S5	37°13.046'N	9°52.604'E	7.5	0.8	50.1	7.4
S6	37°12.998'N	9°55.602'E	3.0	1.5	32.6	7.4
S7	37°11.999'N	9°53.695'E	8.8	1.2	13.0	7.9
S8	37°12.038'N	9°49.403'E	9.7	1.6	89.6	7.4
S9	37°12.214'N	9°48.170'E	4.8	1.3	65.9	7.6
S10	37°11.238'N	9°47.300'E	2.5	1.9	69.3	7.6
S11	37°11.024'N	9°50.533'E	10.3	1.1	90.2	7.9
S12	37°10.957'N	9°51.355'E	9.9	1.0	87.8	7.8
S13	37°11.011'N	9°54.763'E	6.9	1.2	89.4	7.9
S14	37°10.175'N	9°49.375'E	10.1	1.3	91.5	7,6
S15	37°10.197'N	9°51.556'E	9.2	1.0	95.3	7.9
S16	37°09.282'N	9°52.641'E	7.6	1.1	85.1	7.1
S17	37°08.480'N	9°51.573'E	4.2	0.4	15.9	7.3
S18	37°08.537'N	9°49.434'E	3.1	1.0	32.1	7.0

II.2.2.2 Chemicals and materials

A standard mixture (Mix 1: Cat. No. 47927) of 12 PCB congeners (PCB 28, 31, 52, 44, 101, 149, 118, 153, 138, 180, 194 and 209) at 10-µg mL⁻¹ heptane was purchased from Supelco (CIL, USA). OCP standards including *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDT and HCB with purities ranging from 97 % to 99 %, were purchased from Polyscience Corporation Analytical Standards (Niles, IL, USA) and individual standard solutions of each pesticide were prepared in hexane at 1000 µg mL⁻¹. All standard solutions were further diluted with n-hexane to obtain mixed fortifying and GC calibration standard solutions. The internal standards used in our work were supplied by Cluzeau info labo (Sainte Foy la Grande, France, purity 99 %) and diluted in isooctane to suitable concentrations: PCB 30 (1,696.55 ng g⁻¹ isooctane), PCB 103 (1,482.16 ng g⁻¹), PCB 155 (1,548.89 ng g⁻¹) and PCB 198 (1,924.62 ng g⁻¹). The solvents used (n-hexane and dichloromethane) were pesticide quality and were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Hydrochloric acid and sulphuric acid were obtained from Biotechnica. High purity Florisil adsorbent (60–100 mech) was obtained from Fluka, activated at 650 °C and retreated at 130 °C for 5 h; it was stored in a desiccator until use. Anhydrous sodium sulfate suitable for use in pesticide analysis was purchased from Fluka, heated at 300 °C and

stored in an oven at 130 °C. The water used was from a MilliQ system (Milford, Mass, USA). Glass pearls (Roth) were used to fill the headspace of the pressurized fluid extraction cells (Dionex). The certified reference material of marine sediment (EC-3) was purchased from the National Water Research Institute (Canada).

II.2.2.3 Extraction and clean-up

OCPs and PCBs were analyzed in surface sediments following the method described by Montone et al. (2001) with slight modifications for sample extraction and extract clean-up. Briefly, 5 g of freeze-dried sediment were spiked with 30 µL of internal standard (PCB 30, 103, 155 and 198) solution and extracted with dichloromethane in an ASE 200 accelerated solvent extraction system (Dionex, France). The parameters used during the extraction procedure are listed in Table II.2.2. The sample extracts were treated with sulphuric acid (98 %) and then with sodium bicarbonate (5 %) in a separatory funnel. After sulfur removal by activated copper, the extracts were reduced to 2 mL with a rotary vacuum evaporator at 40 °C. A clean-up column containing 5 g of activated florisil topped with 1 cm of anhydrous sodium sulfate was washed with 2 x 15 mL n-hexane. The sample extract was transferred onto the column (10-mm i.d) and eluted with 50 mL of a dichloromethane/*n*-hexane mixture (1/9; *v/v*). The eluate was finally concentrated in a Kuderna-Danish to 1 mL and was ready for GC-ECD analysis.

Table II.2.2 Accelerated solvent extraction (ASE) parameters.

Parameters	Values
Temperature	100 °C
Pressure	100 bars
Static time	8 min
Heat time	5 min
Solvent	Dichloromethane (100 %)
Cycle	2
Flush volume	60 %
Purge time	60 s

II.2.2.4 GC-ECD analysis

Separation and detection of PCBs and OCPs were performed by high-resolution gas chromatography (GC; Agilent 6890 Series gas chromatography system; Agilent Technologies, Philadelphia, PA, USA) equipped with a ⁶³Ni electron capture detector and both PTE-5 (30 m x 0.32 mm i.d., 0.32-µm film thickness) and HP1 (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25-µm film thickness) capillary columns were used. The operating conditions were as follows: Injector temperature, 250 °C; detector temperature, 300 °C; the GC temperature

program was 50 °C (2 min hold) to 160 °C at a rate of 20 °C min⁻¹, and then to 260 °C (10 min hold) at 2 °C min⁻¹; carrier gas was hydrogen (H₂) set up at a flow rate of 1.5 mL min⁻¹; detector make-up gas was nitrogen set up at a flow rate of 60 mL min⁻¹; sample injection volume, 2 µL; injection mode, splitless (1 min). The data presented in this paper were obtained using the PTE-5 column, and a HP1 capillary column was used as second column to confirm the identification of OCs compounds in sediments. Qualitative analysis was done by comparison of retention times with external standards, and quantification of individual OCs was carried out using internal standards (PCB 30, 103, 155 and 198). All results for sediment samples were reported on a dry weight basis (dw).

II.2.2.5 Quality control and quality assurance

All data were subject to quality assurance and control procedures. All the glasswares were washed scrupulously using detergent and subsequently with tap water, distilled water and acetone. Drain the glasswares, baked them in an oven at 130 °C for more than 4 h and finally rinsed with hexane just before use (Rajendran et al. 2005).

The quality of the analytical data was assured using the reference material EC-3 (NWRI, Canada) for HCB and all PCBs analyzed, with the exception of PCB 31 and 149. The whole methodology was verified using this reference material, and the results obtained were in good agreement with the certified values. The recoveries of OCs in the sediments were in the range of 55.5 %–93.0 %. Blanks were run periodically during the analysis to confirm the absence of contaminants. The blank values of the analytical procedure always remained below the limits of detection (LODs). Relative standard deviations of the method ($n=6$) were in the range of 0.01–0.05 %, indicating acceptable repeatability of the method. The correlation coefficients of the calibration curves were superior to 0.993 across a concentration range of 10–30 ng mL⁻¹, representing good linearity of the method. The LODs (signal-to-noise ratio of 3) of OCs were in the range of 0.5–1 ng g⁻¹ dw for OCPs and PCBs.

II.2.2.6 Analysis of Sediment Characteristics

Ten grams of frozen-dried sediment was mixed with 10 ml of deionized water (free of dissolved CO₂), then left standing for 30 min, and the pH value of sediments was determined using a pH meter (PB-10; Sartorius, Germany). Total organic carbon (TOC) contents of sediments were determined by combustion in an LECO CS 125 analyzer (Etcheber et al. 2007). The dried and homogenized sediment samples were acidified in crucibles with 2N HCl to destroy carbonates, then dried at 60 °C to remove inorganic C and most of the remaining acid and water. The analyses were performed by direct combustion in an induction furnace,

and the CO₂ formed was determined quantitatively by infrared absorption. TOC contents are expressed as a percentage of dw of sediment, abbreviated TOC (per cent). The percentage of finer grain size fractions (per cent < 63 µm) of each sediment sample was determined gravimetrically after wet sieving (Savinov et al. 2000). The physicochemical characteristics of the sediments are presented in Table II.2.1.

II.2.3 Results and discussion

With the exception of a coelution between PCB 28 and PCB 31, all OCPs and PCB congeners were well resolved and eluted within a reasonable time under the optimized GC conditions. Concentrations of OCPs and PCBs are summarized in Table II.2.3.

Table II.2.3 Concentrations of OCP and PCB residues in surface sediments collected from Bizerte lagoon (nanograms per gram dry weight).

Station	HCB	<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDE	<i>p,p'</i> -DDD	Σ DDTs	<i>p,p'</i> -DDT/ <i>p,p'</i> -DDE	CB28+ CB31	CB 52	CB 44	CB 101	CB 149	CB 118	CB 153	CB 138	CB 180	CB 194	CB 209	Σ PCBs
S1	2.5	8.8	0.9	1.9	11.5	10.2	nq	0.8	0.9	1.1	1.7	1.1	3.1	3.1	1.6	0.5	0.7	14.6
S2	1.3	0.3	0.1	nd	0.4	3.0	nq	0.1	0.4	0.1	0.2	0.1	0.4	0.3	0.2	nd	nd	1.8
S3	1.5	7.2	0.3	3.1	10.6	24.5	nq	0.4	nd	2.3	0.4	0.2	0.9	0.8	0.4	nd	nd	5.2
S4	2.5	0.5	0.4	nd	0.9	1.4	nq	0.9	nd	nd	0.4	0.2	1.0	0.7	0.4	nd	1.1	4.7
S5	1.9	0.2	0.1	nd	0.3	1.6	nq	nd	nd	nd	0.1	0.1	0.4	0.2	0.1	nd	nd	0.8
S6	2.2	0.2	0.3	nd	0.5	0.8	nq	nd	nd	0.2	0.3	0.1	0.8	0.5	0.4	0.1	nd	2.3
S7	1.2	0.7	0.5	nd	1.1	1.4	nq	0.3	nd	nd	0.2	0.1	0.8	0.5	0.4	0.1	nd	2.5
S8	1.8	0.2	0.4	nd	0.6	0.5	nq	nd	nd	0.2	0.3	0.3	0.9	0.7	1.0	0.1	nd	3.5
S9	0.7	0.5	0.4	0.3	1.2	1.3	nq	0.4	nd	0.2	0.2	0.2	0.5	0.4	0.2	nd	nd	2.1
S10	1.7	0.8	0.5	0.3	1.5	1.5	nq	0.7	0.8	0.2	0.2	0.1	0.7	0.8	0.3	nd	nd	3.9
S11	0.9	0.3	0.3	nd	0.7	1.0	nq	0.3	nd	0.2	0.2	0.1	0.6	0.5	0.3	0.1	0.7	2.9
S12	1.5	0.2	0.3	nd	0.5	0.8	nq	0.5	nd	0.1	0.2	0.1	0.6	0.4	0.2	0.1	nd	2.2
S13	0.9	0.2	0.2	nd	0.3	1.0	nq	0.2	nd	0.2	0.5	nd	1.3	0.9	0.9	0.3	nd	4.2
S14	1.3	0.3	0.4	nd	0.7	0.9	nq	0.3	nd	0.2	0.4	0.3	1.1	0.7	0.5	0.1	nd	3.8
S15	1.2	0.5	0.2	0.2	0.9	2.2	nq	nd	nd	0.1	0.2	0.1	0.8	0.4	0.3	0.1	nd	1.8
S16	1.0	0.4	0.2	nd	0.6	2.2	nq	nd	nd	0.5	0.9	0.3	1.7	1.0	0.7	0.2	nd	5.3
S17	0.9	0.2	0.2	nd	0.5	1.0	nq	0.6	nd	0.8	0.1	nd	0.7	0.3	0.6	0.1	nd	3.1
S18	0.6	0.2	0.2	nd	0.4	1.0	nq	0.3	nd	0.4	0.5	0.1	1.4	0.8	0.9	0.2	0.5	5.2

nd not detected, nq not quantified

II.2.3.1 Polychlorinated biphenyls (PCBs)

Individual and total concentrations of PCB congeners are given in Table II.2.3. PCBs were detected in all sediment samples, demonstrating ubiquitous contamination by these compounds in the aquatic environment of Bizerte lagoon. The most frequently observed congeners were PCBs 149, 153, 138 and 180, which were detected in 100 % of the samples. Congeners 44 and 209 were found in 17 % and 22 % of the samples, respectively. The other congeners were found at most sampling sites. The total PCB levels, defined as the sum of the concentrations of all observed congeners, varied from 0.8 to 14.6 ng g⁻¹ dw, with a mean value of 3.9 ng g⁻¹ dw. As shown in Table II.2.3, the highest level was detected in site S1, indicating a possible presence of a point source near the sampling station S1, which might be related to the sewage discharge of neighboring Bizerte Harbour. In addition, this area is highly populated and characterized by industrial activities including lead and cement manufacturing.

The distribution of total PCBs in surface sediments from Bizerte lagoon revealed that concentrations varied widely, depending on the stations. In addition to S1, relatively high concentrations of PCBs were also observed at stations S3, S4, S10, S13, S16 and S18, and could be related to local anthropogenic sources including garbage incinerators, operations of both repairing facilities and maintenance operations. Inputs are probably attributed to the various rivers opening on the lagoon of Bizerte (Haima River, Tinja River, Gueniche River, Garek River, Guenine River). While in all the other stations the PCB levels ranged from 0.8 ng g⁻¹ dw to 3.8 ng g⁻¹ dw, with a mean value of 2.4 ng g⁻¹ dw. The highest concentration of 3.8 ng g⁻¹ dw was measured at S14, located near to Menzel Bourguiba city with intensive industrial activity: metallurgic industry, naval construction and tire production. However, the lowest concentration of 0.8 ng g⁻¹ dw was found at S5. The geochemical composition (%TOC) of the latter site could be contributing to this observation. Although the station S2 is near to S1, the total PCBs at S2 are low. An explanation for this is that interstation variability may be due to the complex hydrodynamic conditions taking at exchange point S2 between the lagoon of Bizerte and the Mediterranean Sea. Several authors stated that hydrodynamic conditions are the most important factors influencing the distribution of PCBs in surface sediments (Tang et al. 2000; Zhang et al. 2007). The water flow and current velocity which may influence the adsorption and/or sediment transport of contaminants, have been reported as playing an important role in various levels of PCBs in sediments from the Wuhan reach of the Yangtze River, China (Yang et al. 2009).

Other factors can also exert an influence on the distribution of PCBs in sediments. It has been demonstrated that the nature of the sediments influences the distribution and the concentration of PCBs, notably the chemical composition of the sediments (e.g. organic matter, pH and clay contents). The relationship between the concentrations of Σ PCBs and the character of sediment samples has been analyzed (Table II.2.4). These results revealed very good correlation between Σ PCBs and TOC ($r=0.860$, $p<0.001$, $n=18$) and no correlation between Σ PCBs and pH ($r=0.166$, $p>0.05$, $n=18$). This result was consistent with the findings reported by Camacho-Ibar and McEvoy (1996). It is important to note that this relationship does not solely indicate that TOC has a strong sorption capacity for PCBs, but also that such a relationship can result from both PCBs and organic carbon having been derived from similar sources and having been subject to the same transport processes. Another interpretation for the significant correlations is that they are caused by an in situ partitioning process (i.e. organic matter partitioning model that assumes that organic carbon is the main sorptive phase) (Zhou and Rowland 1997). In the aquatic environment, it is generally accepted that the finer grain size fractions of sediments contain higher concentrations of PCBs (Camacho-Ibar and McEvoy 1996). This relationship is due to the greater surface area of the smaller particles providing a larger area for the adsorption of organic matter (Pedersen 1995). However, in this study, the grain size does not seem to influence the sediment adsorption of PCBs, as highlighted by the absence of a correlation between Σ PCBs and the percentage of the grain size $<63\mu\text{m}$ (Table II.2.4). The existence, on one hand, of stations with lowly contaminated sediments (such as S15), but with a high percentage of fine fraction and, on the other hand, of stations with a low percentage of fine fraction, but highly contaminated (such as S1), can provide a possible explanation of the scarce relationship between grain size and organic pollutant concentrations. This suggests that the distribution of contaminants is mainly related to the proximity and importance of the sources.

Because of the multiplicity of parameters controlling PCB geochemistry in the sediment of Bizerte lagoon, the decisive roles of pH, organic carbon and grain size to PCBs might be masked by various factors, including hydrodynamic conditions, proximity and the importance of the sources, deposition, in situ input and degradation etc. For example, proximity to pollution sources as a function of high PCB levels has been reported in sediments from riverine and estuary in Haihe, China (Zhao et al. 2010). According to our findings, the TOC contents of sediments exerted a stronger influence than the pH and sediment grain sizes on the distributions of PCBs.

Table II.2.4 Correlation matrix of OC concentrations and sediment geochemical variables in Bizerte lagoon (n=18).

	HCB	<i>p,p'</i> -DDE	<i>p,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDT	ΣDDT	ΣPCB	TOC	<63 μm (%)	pH
HCB	1	<i>r</i> =0.446	<i>r</i> =0.236	<i>r</i> =0.379	<i>r</i> =0.361	<i>r</i> =0.369	<i>r</i> =0.565*	<i>r</i> =0.059	<i>r</i> =0.098
<i>p,p'</i> -DDE		1	<i>r</i> =0.389	<i>r</i> =0.607**	<i>r</i> =0.595**	<i>r</i> =0.733**	<i>r</i> =0.845***	<i>r</i> =0.065	<i>r</i> =0.488*
<i>p,p'</i> -DDD			1	<i>r</i> =0.928***	<i>r</i> =0.950***	<i>r</i> =0.558*	<i>r</i> =0.696**	<i>r</i> =−0.058	<i>r</i> =−0.207
<i>p,p'</i> -DDT				1	<i>r</i> =0.997***	<i>r</i> =0.789***	<i>r</i> =0.856***	<i>r</i> =−0.091	<i>r</i> =−0.014
ΣDDT					1	<i>r</i> =0.757***	<i>r</i> =0.846***	<i>r</i> =−0.077	<i>r</i> =−0.039
ΣPCB						1	<i>r</i> =0.860***	<i>r</i> =0.029	<i>r</i> =0.166

p*<0.05; *p*<0.01; ****p*<0.001

In terms of individual congener distributions of the ten PCBs, it was clearly observed that the predominant of congeners were PCB153, PCB138 and PCB180 with six and seven chlorines (Figure II.2.1). Their quantitative ratios differ considerably at different stations and exhibit a complex pattern. On average these compounds collectively accounted for 60 % of total PCBs. The other congeners generally made up a small individual contribution to total PCBs. Overall, the contribution of different congeners towards the total PCBs content in the whole sediment was in the order CB153 > CB138 > CB180 > CB149 > CB101 > CB52 > CB118 > CB209 > CB194 > CB44. The observed congener distribution towards more highly chlorinated compounds is consistent with previously published data in this lagoon and in other worldwide environments, indicating the preferential retention of these less volatile and more lipophilic compounds in the marine sediments (Nhan et al. 2001; Derouiche et al. 2004; Parolini et al. 2010). Differences in congener composition in the aquatic systems may also be attributed to a decline in the proportion of less chlorinated PCBs that are more susceptible to losses through volatilization, sedimentation and possibly microbial degradation (Quensen et al. 1988; McDonald et al. 1992). Moderately and highly chlorinated PCBs may therefore be more persistent in the aquatic environment because they are less volatile and more soluble in lipids, adsorb more readily to sediments, and are more resistant to microbial degradation (Connell 1988; Tyler and Millward 1996).

The presence of tetrachloro- (CB52), pentachloro- (CB101 and CB118), and hexachloro congeners (CB138 and CB153) in sediments of the Bizerte lagoon is consistent with a contribution of commercial PCB mixtures, which have been widely used in transformers, electrical equipment, and other industries in several countries (Barakat et al. 2002). The usage of PCBs in Tunisia is not well established, but the use of PCBs in transformers, electrical equipment and other industries is common. Very active industrial facilities are located in close

vicinity to the Bizerte lagoon. Since the 1950's, about 100 industries settled at the vicinity of the lagoon, the most important being the cement factory (1950) and the steel complex "El Fouledh" (1965). Until 1985, one company in Tunisia (SACEM, in the Menzel Bourguiba area) was manufacturing electrical transformers to meet national requirements. From 1970 to 1985, this company imported 900 tonnes of PCBs and manufactured about 908 transformers (APEK 2005).

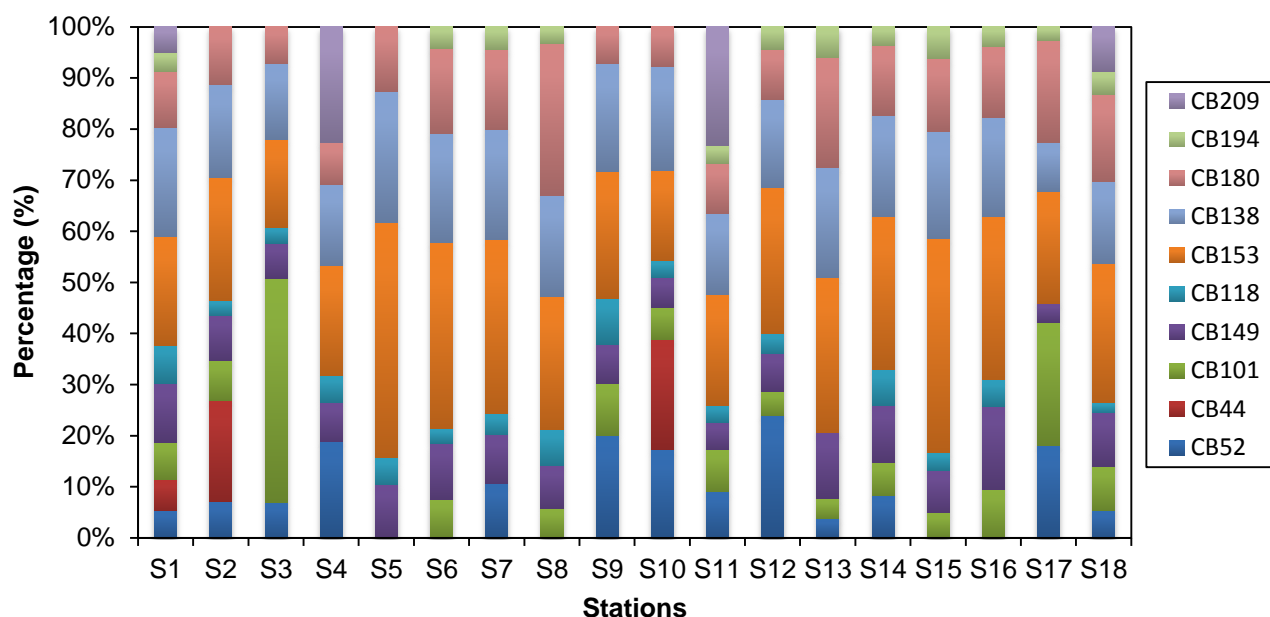


Figure II.2.1 Percentage contribution of individual polychlorinated biphenyls at each station in sediments of Bizerte lagoon.

The comparison of OC concentrations observed in other regions of the world is difficult because of the geological characteristics of the sampling areas, the analytical method, the number of samples and number of compounds analyzed in the different studies that may not be the same. However, a general idea of pollutant levels of other coastal areas may be useful. In Table II.2.5, the levels of organochlorine compounds in sediment samples recorded in this study are compared with those of other countries. As it can be seen in Table II.2.5, the PCB concentrations in surface sediments of Bizerte lagoon in Tunisia are similar to those reported for Bengal Bay, India (Rajendran et al. 2005), Han River, Korea (Kim et al. 2009), Tonghui River, China (Zhang et al. 2004b), Cienfuegos Bay, Cuba (Tolosa et al. 2010), Bizerte lagoon, Tunisia (Derouiche et al. 2004) and Gulf of Lions, France (Tolosa et al. 1995). However, they are much lower than those measured in Alexandria harbor, Egypt (Barakat et al. 2002), Offshore Barcelona, Spain (Tolosa et al. 1995), Firth of Clyde, Scotland (Kelly and Campbell

1995), Rhone Prodelta, France (Tolosa et al. 1995), Haihe River, China (Zhao et al. 2010) and Coast of Korea (Hong et al. 2006).

Table II.2.5 Comparison of OCP and PCB concentrations (nanograms per gram dry weight) in surface sediments from various locations in the world.

Location	Year	Σ PCBs	Σ DDTs	HCB	Références
Bizerte lagoon, Tunisia	2011	0.8–14.6 (Σ^{10} PCBs)	0.3–11.5 ^b	0.6–2.5	Present study
Bizerte lagoon, Tunisia	2001	0.89–6.63 (Σ^{20} PCBs)	NA	NA	Derouiche et al. (2004)
Bengal Bay, India	1998	0.02–6.57 ^g	0.04–4.79 ^a	NA	Rajendran et al. (2005)
Han River, Korea	2005	0.042–4.53 ^h	1.05–8.94 ^a	0.485–3.73	Kim et al. (2009)
Coast of Korea	1997–2002	0.170–371 (Σ^{18} PCBs)	0.010–135 ^a	nd–2.59	Hong et al. (2006)
Tonghui River, China	2002	0.78–8.74 (Σ^{12} PCBs)	0.11–3.78 ^b	NA	Zhang et al. (2004b)
Haihe River, China	2007	0.177–253 ^h	nd–155 ^c	nd–835	Zhao et al. (2010)
Cienfuegos Bay, Cuba	2005	3.1–11.31 (Σ^{11} PCBs)	0.26–5.63 ^b	<0.015–3.5	Tolosa et al. (2010)
Rhone Prodelta, France	1987–1991	38.3–228.5 (Σ^{12} PCBs)	62–675 ^d	11.2–39.4	Tolosa et al. (1995)
Gulf of Lions, France	1987–1991	4.1–8.9 (Σ^{12} PCBs)	3.5–11.5 ^d	0.2–1.5	Tolosa et al. (1995)
Offshore Barcelona, Spain	1987–1991	4.2–57.3 (Σ^{12} PCBs)	4.4–76.2 ^d	0.4–2.9	Tolosa et al. (1995)
Firth of Clyde, Scotland	1989	0.5–500 (Σ^7 PCBs)	0.5–262 ^e	0.1–12	Kelly and Campbell (1995)
Alexandria harbor, Egypt	1998	0.9–1211 (Σ^{96} PCBs)	<0.25–885 ^f	NA	Barakat et al. (2002)

NA Data is not available

^a Sum of *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT

^b Sum of *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDT

^c Sum of *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT

^d Sum of 2,4'-DDE, 4,4'-DDE, 2,4'-DDD, 4,4'-DDD, 2,4'-DDT, 4,4'-DDT

^e Sum of 4,4-DDE, 4,4-DDD, 4,4-DDT

^f Sum of 2,4'-DDT, 4,4'-DDT, 2,4-DDE, 4,4'-DDE, 2,4-DDD, 4,4'-DDD

^g Sum of Arcolor 1242, 1248, 1254, 1260

^h PCB data expressed on an Alocolor and Kanechlor mixture basis

II.2.3.2 Organochlorine pesticides (OCPs)

The chlorinated organic compounds constitute the most important group of herbicides and are synthetically produced organic chemical compounds, with a circular structure in which the hydrogen molecules have been substituted by chlorine (Haynes and Johnson 2000). These pesticides are the ones found mostly in the environment because they were used extensively for at least two decades (1950–1970); their stable structure and their very poor solubility in water makes their accumulation in sediments easier. In the sediments of Bizerte lagoon, the major OCPs detected are DDTs and HCB. HCB, *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDT showed the highest frequency of detection (100 %), followed by *p,p'*-DDD (28 %).

II.2.3.2.1 DDTs

Concentration of total DDTs (\sum DDTs) ranged from 0.3 to 11.5 ng g⁻¹ dw, with a mean of 1.9 ng g⁻¹ dw (Table II.2.3). Concentrations of *p,p'*-DDT in the sediments of Bizerte lagoon varied from 0.2 to 8.8 ng g⁻¹ dw with the highest values observed at S1 (8.8 ng g⁻¹ dw) and S3 (7.2 ng g⁻¹ dw); *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDD concentrations ranged from 0.1–0.9 ng g⁻¹ dw to nd–1.9 ng g⁻¹ dw, respectively, with maximum values observed at sites S1 and S3. \sum DDTs reached maximum value at station S1 (11.5 ng g⁻¹ dw), which was similar to the results obtained for PCBs, followed by station S3 (10.6 ng g⁻¹ dw). The minimum value of total DDTs was recorded at S5 and S13 (0.3 ng g⁻¹ dw), whereas the other stations followed almost an equal trend of DDT distribution ranging from 0.4 to 1.5 ng g⁻¹ dw. The high values of total DDT residue levels at site S1 might result from the discharge of untreated effluents from the Bizerte city. Additionally, the high content of organic carbon in sediments at S1 may also favour DDT accumulation at this location. The station S3 is near the Haima River. The DDT residues likely issued from the agricultural areas located upstream in the Haima River catchment and could be transported and deposited in the downstream sediment. The use of DDT was widespread in Tunisia during the 1940s and 1980s and was banned in the early 1984s (APEK 2005). The high concentrations of DDTs and related compounds in this lagoon indicate that DDT usage was heavy and that the lagoon had received significant amount of DDTs from river outflow and surface runoff. In Tunisia, the old stockpiles of DDT were estimated at 45 tonnes (APEK 2005) and were stored in unsatisfactory conditions, and this may explain the relatively elevated concentration of \sum DDTs reported in this study. The levels of DDTs in sediments in present study compared with those in other parts of the world were shown in Table II.2.5. As seen in Table II.2.5, DDTs levels in sediments from the Bizerte lagoon were relatively high (0.3–11.5 ng g⁻¹ dw) and similar to those in sediments from

Bengal Bay, India (Rajendran et al. 2005), Han River, Korea (Kim et al. 2009), Tonghui River, China (Zhang et al. 2004b), Cienfuegos Bay, Cuba (Tolosa et al. 2010), Bizerte lagoon, Tunisia (Derouiche et al. 2004) and Gulf of Lions, France (Tolosa et al. 1995).

Figure II.2.2 shows *p,p'*-DDT and their metabolites as a percentage of total DDTs at the different sampling sites. As shown in Figure II.2.2, the average contributions of DDT congeners mixture detected in the sediment samples were in the order *p,p'*-DDT (54 %)>*p,p'*-DDE (40 %)>*p,p'*-DDD (6 %). The predominance of DDTs in the sediment was also reported by Pandit et al. (2002) from the coastal marine environment of Mumbai, western part of India. This may be attributed to the slow degradation of DDTs or recent input of DDTs in this environment (Yuan et al. 2001). The predominance of either *p,p'*-DDT or both *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE in sediments was also recorded by Guruge and Tanabe (2001) from the west coast of India and by Booij et al. (2001) from the northwest coast of Java, Indonesia. Technical DDT generally contains 75 % *p,p'*-DDT, 15 % *o,p'*-DDT, 5 % *p,p'*-DDE and <5 % *p,p'*-DDD (Metcalf 1973). If there was no new technical DDT input, the compositional percentage of *p,p'*-DDT would decrease with time and the metabolites *p,p'*-DDE+*p,p'*-DDD would increase. Therefore, the ratio of *p,p'*-DDT/*p,p'*-DDE can be used as an indicator to identify a recent input of technical DDT (Strandberg et al. 1998). Ratios <0.33 generally indicates no recent input. In the present study, ratio values above 0.33 were found in all sites (Table II.2.3), indicating a recent input of technical DDT. Particularly, *p,p'*-DDT/*p,p'*-DDE ratios up to 10.2 and 24.5 in sediment samples collected at stations S1 and S3 respectively signified a very recent input of DDT in the Bizerte lagoon. Hassine et al. (2012) made the same conclusion for the recent input of DDTs based on concentration levels of DDTs in the breast milk. DDT might originate from illegal usage of DDT in suburban agriculture, leakage from remaining stockpiles and unsecured landfills, or vector control and hygienic purposes (Minh et al. 2004). In Tunisia, preliminary studies in 1997 revealed the existence of a number of stocks of obsolete pesticides, containing mostly HCH, DDT and other organochlorines. These stocks were created mostly through massive overprovision in relation to actual needs for public health vector control and combating migratory pests such as locusts. Some of these stocks date back more than 45 years. The stock of obsolete or unwanted pesticides was estimated in 2001 at 882 tonnes. This figure was updated, in 2003, to 8,4000 liters and 1,472 tons of obsolete pesticides spread all over the country in some 132 sites (APEK 2005). These pesticides are presently stored in unsatisfactory conditions and pose risks of dispersion into the environment.

In the environment, *p,p'*-DDT can be biodegraded to *p,p'*-DDE under aerobic conditions and to *p,p'*-DDD under anaerobic conditions (Aislabie et al. 1997). The rate of degradation depends on several factors including sediment type, temperature and organic carbon content. Higher levels of DDE compared to DDD in samples would suggest a slightly oxidizing environment (Mostafa et al. 2007). It can be seen from Figure 3 that *p,p'*-DDE was the predominant compound at most sampling sites, suggesting possible degradation of DDT through aerobic processes. This is consistent with high hydrodynamic conditions in the Bizerte lagoon favoring water oxygenation and therefore microbial metabolism of DDT to DDE.

The distribution of OCPs in sediments influenced by physicochemical properties of sediments was observed in this study. Correlations between OCPs and sediment geochemical variables are listed in Table II.2.4. These results showed that there were a significant positive correlation between TOC contents and concentrations of Σ DDTs ($p < 0.001$) and HCB ($p < 0.05$). This suggests that the distribution of DDTs and HCB may be controlled mainly by the distribution of organic matter in the sediments. The results agree well with those reported by Lee et al. (2001) and Hong et al. (2003). In addition, the correlation of *p,p'*-DDE with pH was significant ($p < 0.05$) in this study since pH affects the concentration of OCPs in sediments by modifying the structure of humus or impacting the biodegradation of OCPs (Wenzel et al. 2002). Analysis of particle sizes of sediments show no significant correlation between finer fraction $< 63\mu\text{m}$ and concentrations of Σ DDTs and HCB ($p < 0.05$) (Table II.2.4). This indicated that particle size has no effect on the sorption and partition of OCPs in sediment, which had been documented by many other field investigations (Lee et al. 2001; Young and Weber 1995).

To estimate the possible sources of OCPs in the catchment, the contamination pattern was further studied. There was a significant positive correlation between *p,p'*-DDD and Σ DDTs ($p < 0.001$), *p,p'*-DDE and Σ DDTs ($p < 0.01$) probably reflecting a common origin of the DDT for all the sites within the lagoon (see Table II.2.4). Similarly, the correlation between Σ DDTs and Σ PCBs ($p < 0.01$) suggest that these contaminants may have a common source. In this study, the significant correlation between *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE ($p < 0.01$), *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDD ($p < 0.001$) indicated that *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDD originated mainly from the degradation of *p,p'*-DDT.

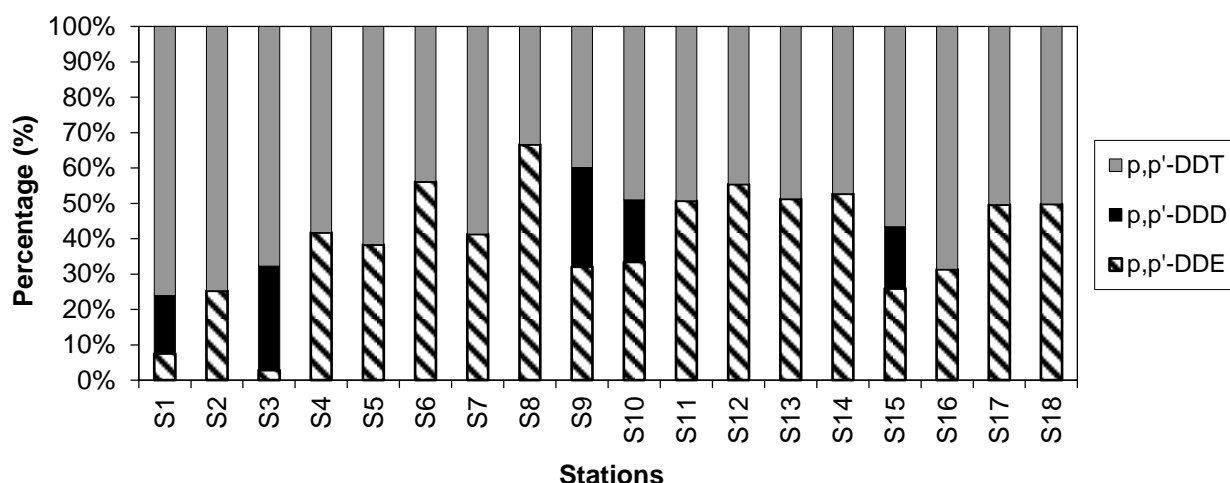


Figure II.2.2 Relative distribution of p,p'-DDT and its metabolites p,p'-DDD and p,p'-DDE in sediments from Bizerte lagoon.

II.2.3.2.2 Hexachlorobenzene (HCB)

HCB was detected in all surface sediment samples and the concentrations ranged from 0.6 to 2.5 ng g⁻¹ dw with a mean value of 1.4 ng g⁻¹ dw (Table II.2.3). The highest concentrations were found at stations S1 and S4, while the lowest concentration was detected at S18. The presence of HCB has been also reported by Ennaceur et al. (2008) and Hassine et al. (2012) in the same region based on concentration levels of HCB in the breast milk.

Hexachlorobenzene (HCB) is a widespread contaminant that has entered the environment through its past manufacture and use as a pesticide and its formation as a by-product during the production of a variety of chlorinated compounds. Furthermore, HCB has also been released into the environment by waste incineration (van-Birgelen 1998) and in a variety of reactions where it persists because of its thermodynamic stability (Breivik et al. 2004). In aquatic systems, HCB is persistent in sediments and tends to accumulate in the tissues of organisms. It has been reported that HCB in sediments can be gradually released into the environment leading to chronic environmental contamination (Wania and Mackay 1996). HCB was used mainly as fungicide treatment for seeds in Tunisia, but its use has been banned since 1984 (APEK 2005). Recently, there are no commercial uses of HCB, but it can be released from certain thermal processes in the metallurgical industry, oil refinery and also from motor vehicles.

Compared with data acquired by studies conducted in other parts of the world, table II.2.5 shows that HCB concentrations (0.6–2.5 ng g⁻¹ dw) are comparable with almost all locations,

except Haihe River, China (nd–835 ng g⁻¹ dw) (Zhao 2010) and Rhone Prodelta, France (11.2–39.4 ng g⁻¹ dw) (Tolosa et al. 1995), where elevated HCB levels were reported.

II.2.3.3 Principal component analysis (PCA)

PCA is a multivariate analysis technique for dimension reduction, which allows pattern recognition in complex datasets. In this study, PCA was applied to study the sources of OCs in surface sediments. The plot of loading factors for the first and second principal components (PCs) is shown in Figure II.2.3. Approximately only 26 % of the data variability could be explained by the PC2, indicating that there are many other factors influencing the OCs distributions in the Bizerte lagoon. PC1 accounted for 55.5 % of the total variance. As shown in Figure II.2.3, the PCA results allows distinguish two groups. The aggregation demonstrates similar sources, while the scatter indicates multiple sources of OCs in the surface sediments. The first group is represented by the PCB 44, 52, 118, 149, 194 and 209. The majority of these congeners were founded as specific congeners in the flue gas samples (Kim et al. 2004). The second group was constituted by the dominant PCBs (PCB 138, 153 and 180) as mentioned above.

Atmospheric particulates play an important role in conveying PCBs over long distances into the aquatic environment. The PCA results showed that HCB and 4,4' DDT were clearly separated from other compounds, this which may be associated with atmospheric deposition.

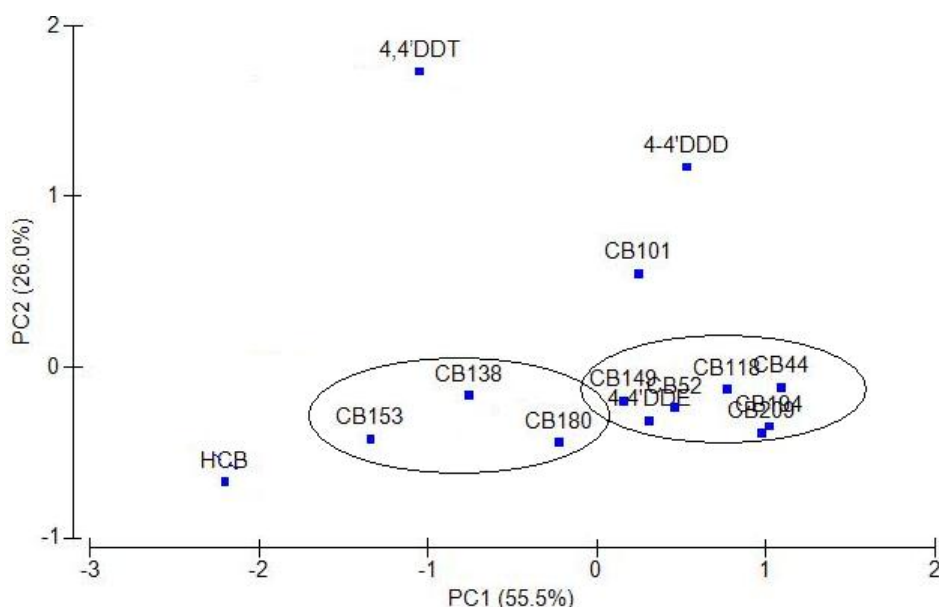


Figure II.2.3 Principal component analysis (PCA) of source contributions for POPs in the surface sediments from Bizerte lagoon.

II.2.3.4 Ecotoxicological concerns

Contaminated sediments can represent potential risks to sediment-dwelling organisms such as benthic and epibenthic species. In this study, to evaluate the ecotoxicological significance of sediment pollution by PCBs and OCPs in Bizerte lagoon, sediment quality guidelines (SQGs) specified by the USEPA (United States Environment Protection Agency USEPA 1997) and by the Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME Canadian Council of Ministers of the Environment 2002) were applied. Effects range-low (ER-L) and effects range-median (ER-M) values are used to predict potential impacts of contaminants in sediments; ER-L values correspond to the lower 10 percentile and ER-M values to median values, when the concentrations of a contaminant in marine sediments are sorted according to the degree of their effects levels. ER-L represents the value at which toxicity may begin to be observed in sensitive marine species, whereas ER-M represents the concentration below which adverse effects are expected to occur only rarely. In addition, the threshold effect level (TEL) and the probable effect level (PEL) are used as the criterion for the prediction of toxicity, and corresponds respectively to the concentration below, which no effect are observed and the concentration above which adverse effects are frequently expected.

Sediment quality criteria and concentration ranges of major organochlorine contaminants are summarized in Table II.2.6. The *p,p'*-DDE and \sum PCBs concentration are below ER-M, ER-L, PEL and TEL values at all stations, suggesting rather low ecological risk of those compounds. Concentrations levels of *p,p'*-DDD is higher than ER-L at one site (S3) and higher then TEL at two sites (S1 and S3), but were significantly lower than the ER-M and PEL values. The maximum concentrations of *p,p'*-DDT in the sediments of Bizerte lagoon were measured at S1 and S3. DDT concentrations at these two locations exceed the ER-M and PEL values. For \sum DDTs the levels at all sample locations do not exceed the ER-M or PEL values, with the exception of sites S1 and S3, which show concentrations above the ER-L and TEL values. It could thus be assumed that DDT accumulated in sediments at sites S1 and S3 could have potential ecotoxicological impact on benthic fauna.

Consensus-based threshold effect concentrations (TECs) and probable effect concentrations (PECs) also provide a means of classifying sediments as toxic or non-toxic. These indexes, calculated following the methodology described by MacDonald et al. (2000), are available for PCBs and \sum DDTs. TEC and PEC values were 2.5 and 39 ng g⁻¹ dw for DDTs and 29 and 274 ng g⁻¹ dw for PCBs, respectively. On this basis, sixteen sites fall below TEC for total DDT (Table II.2.6), whereas two sediment stations, namely S1 and S3, lie

between TEC and PEC, indicating potential toxicity of the sediments. For total PCBs, the 18 surface sediment samples did not exceed the TEC and the PEC guidelines. Thus, concentrations of PCBs found in Bizerte lagoon sediments are not expected to be a threat to benthic marine organisms.

Those guidelines for OCPs and total PCBs are much higher than the concentrations observed in this study, suggesting rather low ecotoxicity of OCP and PCB contamination in the sediment of Bizerte lagoon. Besides, considering the fact that so far, no treatment facility for municipal and industrial discharges is available in this area, there should be concerns toward potential pollution by several other organic contaminants such as medicine, body-care products, and surfactants. Therefore, further studies toward possible adverse effects of total organic pollutants in the Bizerte lagoon sediments using toxicity tests (Chapman et al. 2002) may be necessary to provide more comprehensive hazard assessment.

Table II.2.6 Comparison of OCP and PCB concentrations in sediments of the study area with E-RL, E-RM TEL and PEL values (nanograms per gram dry weight).

	ER-L	ER-M	TEL	PEL	Range (ng g ⁻¹)
Σ PCBs	22	180	21.6	188.8	0.8–14.6
<i>p-p'</i> -DDT	1	7	1.2	4.8	0.2–8.8
<i>p-p'</i> -DDD	2	20	1.2	7.8	nd–3.1
<i>p-p'</i> -DDE	2	27	2.1	374.2	0.1–0.9
Σ DDTs	2	46	3.9	51.7	0.3–11.5

ERL and ERM values from Long and Morgan (1990) and Long et al. (1995)

TEL and PEL from MacDonald et al. (1996)

II.2.4 Conclusion

The concentrations of PCBs and OCPs have been determined in surface sediment from eighteen stations in the Bizerte lagoon, Tunisia. The levels of these contaminants are generally low to medium relative to other areas of the world. The contents of these compounds were found in the decreasing order: PCBs > DDTs > HCB. The predominant compounds were PCB 153, 138 and 180 among PCBs, and *p,p'*-DDT among DDTs in sediments. The high detected concentration of *p,p'*-DDT depicts that there is a recent input of technical DDT. The best explanation for the detection of OCPs and PCBs today is mainly due to their persistence, long half-life and to the lipophilicity of the parent compound as well as of the metabolic forms in which they transform.

Hydrological and sedimentological characteristics of Bizerte lagoon such as water flow, current velocity and TOC content can influence the spatial distribution of OCPs and PCBs in sediments. Our results indicated that adverse biological effects associated with the OCP and PCB levels at most of the studied sites in Bizerte lagoon should be insignificant, whereas the pollution levels measured at stations S1 and S3 could potentially represent a risk for aquatic life.

In order to determine the sources of the detected contaminants, intensive sampling and analysis of effluents and runoff patterns would be needed. Sediment screening using bioassays can also be conducted for both sediment quality evaluation but also to identify potent toxicants using the Toxicity Identification Evaluation approach.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia for its financial support.

Conclusion

Cette étude a permis de déterminer les niveaux de contamination des sédiments superficiels de la lagune de Bizerte par les contaminants organiques. L'examen de la distribution des ces contaminants ainsi que de certains critères qualitatifs et quantitatifs a permis d'évaluer les principales sources de cette contamination.

L'étude de la contamination par les HAP indique que les concentrations présentes dans les sédiments de surface étudiés sont faibles à modérées et proviennent principalement d'origine pyrolytique. Parmi les stations étudiées, la station S1 située dans le canal de Bizerte apparaît comme le plus contaminée par les HAP (concentrations totales comprises entre 9,3 et 55,5 ng g⁻¹ ps). D'une manière générale, la composition en HAP est dominée par les composés de hauts poids moléculaire (quatre à cinq cycles aromatiques) d'origine pyrolytique.

Les niveaux de contamination par les PCB et les pesticides organochlorés sont faibles à moyen, leur distribution est relativement homogène, avec une contamination essentiellement confinée dans les stations S1 et S3. Contrairement aux HAP, les caractéristiques sédimentologiques de la lagune de Bizerte telles que la granulométrie et la teneur en carbone organique total peuvent influencer sur la répartition spatiale des OCPs et PCBs dans les sédiments. Les rapports élevés de la Σ PCBs/ Σ DDTs indiquent une prédominance des rejets industriels par rapport aux activités agricoles dans la zone étudiée.

La toxicité potentielle des sédiments due aux HAPs, PCBs et OCPs a été évaluée grâce à différentes valeurs guides sédimentaires. Les différents critères appliqués à nos sédiments montrent que les stations S1 et S3 présentent des niveaux de contamination supérieurs aux seuils ERL (effects range low) et ERM (effects range median). Ces deux stations sont donc susceptibles de présenter un risque important pour la faune benthique, lors de la remise en suspension des sédiments, par des phénomènes naturels (marée, tempêtes, bioturbation) et par l'activité humaine comme les opérations de dragage.

Avant de conclure de manière définitive sur la toxicité des sédiments étudiés, il serait nécessaire d'évaluer de manière plus précise la biodisponibilité des ces contaminants et de réaliser des tests biologiques.

Les critères de toxicité utilisés ici prennent uniquement en compte la contamination par les HAPs, les PCBs et les OCPs et non pas les effets d'autres contaminants tels que les éléments traces métalliques. Nous allons donc aborder dans le chapitre suivant les résultats relatifs à l'évaluation de la toxicité des sédiments en utilisant des tests biologiques en relation avec les concentrations des contaminants organiques et métalliques mesurés.



CHAPITRE III

EVALUATION DE LA TOXICITÉ DES SÉDIMENTS DE LA LAGUNE DE BIZERTE

Introduction

Au précédent chapitre, nous avons décrit l'application des analyses chimiques et des valeurs guides sédimentaires pour l'évaluation du potentiel toxique de sédiments lagunaires. Cependant, le dosage chimique des contaminants dans les sédiments ne suffit pas à prévoir les impacts toxicologiques sur les organismes exposés. Il existe donc un besoin urgent d'utiliser plus largement les bioessais (tests biologiques), qui peuvent remplir différentes fonctions dans le contrôle de la pollution marine, et compléter les autres techniques employées. Les bioessais peuvent mettre en évidence la présence de contaminants non détectés par l'analyse chimique, ou que l'on ne sait pas doser.

L'objectif du présent chapitre est d'évaluer la toxicité potentielle des sédiments à l'aide d'une batterie de bioessais (Microtox[®] et SOS-Chromotest[®], test MELAc). Parmi les différents traitements sédimentaires couramment utilisés, trois ont été retenus pour cette étude: le "sédiment contact", l'extrait organique et l'élutriat. Le premier permet d'étudier les effets des sédiments vis à vis des organismes benthiques, le second traduit l'effet des composés organiques hydrophobes, alors que le troisième reflète la toxicité des xénobiotiques sédimentaires relargués dans l'eau lors de la remise en suspension des sédiments.

III. Article 3: Evaluation of sediment toxicity using a battery of assays.

Application to sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia

Badreddine Barhoumi ^a, Laure Landi ^b, Christelle Clérandeau ^b, Anaïk Pichon ^b, Floranne Lebihanic ^b, Pierre Anschutz ^b, Dominique Poirier ^b, Mohamed Ridha Driss ^a, Jérôme Cachot ^{b,*}

^a Laboratory of Environmental Analytical Chemistry (05/UR/12-03), University of Carthage, Faculty of Sciences of Bizerte, 7021 Zarzouna, Bizerte, Tunisia

^b University of Bordeaux, CNRS, UMR EPOC 5805, avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France

In preparation.

Abstract

Chemical analyses and bioassays were used in conjunction to assess the quality of sediments of the Bizerte lagoon. A comprehensive assessment of potential sediment toxicity requires the consideration of multiple exposure phases. The Microtox[®] basic test and the 100% test were used to assess the toxicity of sediment organic extracts and aqueous sediment elutriates, respectively. In addition, solvent extracts were assayed with the SOS-Chromotest (with and without S9) for detection of the genotoxic potency of sediments. We also proposed an embryo-larval test to evaluate embryotoxicity of sediment-bound contaminant. Pre-blastula stage medaka (*Oryzias latipes*) embryos were exposed by sediment contact to the five sediment samples during the whole 20-day embryonic development. Lethal and sub-lethal adverse effects were recorded in both embryos and larvae for 20 days postfertilisation (dpf) using several endpoints (mortality, abnormality, cardiac activity, hatching delay and hatching success). The toxicity bioassays indicated that the sample collected from station S3 was the most toxic to *V. fischeri*, with 30 min-EC50 value of 80.6 mg mL⁻¹; and sample from station S1 showed the high genotoxicity to *Escherichia coli*, with an IF of 1.95 ± 0.12 and the higher developmental toxicity to Japanese medaka. The genotoxic activity was detected only after adding an S9 microsomal fraction, suggesting the preponderant involvement of pro-genotoxic organic compounds. The results demonstrate differences in the sensitivities of the different assays due likely to the large variety of pollutants occurring in sediments from the Bizerte lagoon. This emphasizes the need for data with multiple bioassays, when estimating the toxicity of complex matrix such as sediment. Also, the results of this study have important implications for risk assessment in lagoons and coastal waters in Tunisia, where, at present

the monitoring of sediment and water quality is predominantly based on chemical analysis alone.

Keywords: Bioassays • sediments • Toxicity • Genotoxicity • Embryo-toxicity • *Oryzias latipes* • Bizerte lagoon

III.1 Introduction

On a worldwide scale, the emission of anthropogenic chemicals has resulted in increasing contamination of natural resources in marine and freshwater systems (Segner and Braunbeck 1998). Pollutants enter freshwater ecosystems from agricultural and urban areas, and from industrial production sites by drainage, superficial runoff, rainwater and discharges of waste water. Most chemicals of anthropogenic origin tend to be adsorbed on particulate matter and finally accumulate in the sediment (Burton 1991; Ahlf 1995). Contaminated sediments can be directly toxic to aquatic life (Swartz et al. 1985) or can be a source of contaminants via bioaccumulation through the food web (Mac et al. 1984). Thereby, in the last few decades many approaches have been developed for the assessment of sediment quality. They may be classified by their ability to develop criteria which can be divided into chemical, biological–ecotoxicological, chemical–ecotoxicological, and integrated approaches (Zimmer and Ahlf 1993; Power et al. 1991).

As sediment is a heterogeneous medium, organisms living in or at the surface may be exposed to contaminants dissolved in the overlying water or in porewater, or by direct contact with toxicants adsorbed onto sediment particles; therefore sediment samples for assessment should be separated into different phases for testing (Fig. 2). The use of elutriates provides information on the leaching capability of sediment-associated contaminants, and as such may be considered as an important route of toxicant exposure following the disposal and relocation of dredged material and sediments. Toxicity tests employing elutriates may therefore yield important data on the potential adverse effects to water column organisms following disturbance of the underlying sediment (Cheung et al. 1997; Wong et al. 1999), but are unlikely to provide information on the possible effects of contaminants retained on the solid phase and deposited on the seabed. Organic solvent extraction allows extraction of most organic pollutants sorbed onto particulate matter. A major drawback of assaying sediment toxicity is that the toxicity of the extracts may not be solely associated with anthropogenic contamination. Common macrocompounds (e.g. ammonia and sulphur) derived from the natural processes of organic matter decomposition can accumulate in the sediment and cause

toxic effects once they are made bioavailable through the extraction process (Gagné et al. 1999; Pardos et al. 1999). However, whole sediment exposure is generally considered as the most realistic integrative method to mimic the *in situ* contamination of organisms because the uptake route (including sediment-contact and aqueous phase exposure) is very similar to that in environmental conditions, taking sediment characteristics and chemical properties into account (Hollert et al. 2003; Kosmehl et al. 2006; Mages et al. 2008). After consideration of each test phase and their associated pros and cons the testing of all exposure routes affords a more comprehensive appraisal of sediment toxicity. In addition, the use of a battery of test species, from various phyla and trophic levels, has been advocated by a number of researchers (Dutka et al. 1989; Giesy and Hoke 1989; Matthiessen et al. 1998; Nendza 2002), since testing single may not detect contaminants with a specific mode of action.

Here we employ a multiassay approach in order to characterise the toxicity of Bizerte lagoon sediment samples. Heterotrophic bacteriae play a vital role as decomposers in aquatic systems and hence there is justification for their inclusion in a test battery for the assessment of sediment toxicity. Also, in recent years, fish embryos have gained interest in risk assessment procedures because of their high sensitivity to pollutants and their ecological relevance (e.g. recruitment, population wellness, Burton 1991; Cao et al. 2009). Considering that sediments are putative spawning substrates for many pelagic and benthic organisms including fish, the use of fish early life stage (ELS) to evaluate sediment contamination would enable effects on survival, hatchability, development and growth, which are considered as critical endpoints to be monitored (Burton 1991). Three bioassays were employed in this study: the Microtox[®] was applied to measure acute toxicity of sediment organic extracts and on aqueous sediment elutriates. The SOS-Chromotest was applied for measuring the genotoxic potency of sediment organic extracts. The Medaka Embryo-Larval Assay in sediment-contact (MELAc) was used for whole-sediment toxicity testing. In this assay, embryos of the Japanese medaka *Oryzias latipes* are incubated at the surface sediment for the whole duration of the embryonic phase. In fact, this species offers several advantages for developmental toxicity testing, i.e. transparent chorion, lack of pigments in embryos which facilitates non-invasive observations during the development; sensitivity to toxicant exposure (e.g. Gonzalez-Doncel et al. 2003; Farwell et al. 2006; Gonzalez-Doncel et al. 2008); well-described stages of development (Iwamatsu 2004; Gonzalez-Doncel et al. 2005); small size; adaptability to various environmental conditions (Carlson et al. 2002; Wittbrodt et al. 2002; Yao et al. 2010); low maintenance cost; short maturation time (Wittbrodt et al. 2002) and spawning all over the year in good breeding conditions (Iwamatsu 2004). Furthermore, Japanese medaka is tolerant

to a wide range of temperatures and salinities allowing experiments in very contrasted thermal and salinity conditions. Finally, one of the major advantages of the Japanese medaka is the low baseline embryo and larval mortality (Barjhoux et al. 2012).

The Bizerte Lagoon (Northern Tunisia) is an area of vital environmental importance. Many resident marine species live and feed in this area, and many of the pelagic species reproduce there. However, this lagoon is subjected to many anthropogenic pressures including urbanization, industrial activities (cement works, metallurgical industry, boatyards), as well as naval and commercial shipping harbors. Lagoon shores have also been used as open-air waste-dumping sites. The occurrence of several chemicals (OCPs, PCBs, PAHs, PBDEs and heavy metals) in the sediment of Bizerte lagoon have been documented in previous studies (Cheikh et al. 2002; Derouiche et al. 2004; Trabelsi and Driss 2005; Ben Garali et al. 2010; Barhoumi et al. 2013, 2014). However, no data were available on the ecotoxicity effects of the Bizerte lagoon sediments.

Thus, the purpose of the present study was: (1) to evaluate the toxicity associated with each sediment exposure phase; (2) to examine the relationship between observed toxicity and results of chemical analysis ; and (3) to evaluate the quality of the Bizerte lagoon sediments using the MELAc. In the course of the exposure several lethal and sublethal endpoints were followed at both embryonic and larval stages, including cardiac activity, hatching success, developmental abnormalities and survival.

III.2 Materials and methods

III.2.1 Sampling locations

The Bizerte lagoon is the second largest lagoon in Tunisia, is located in an economically very important area in northern Tunisia (latitude, 37°80'–37°14'N; longitude, 9°46'–9°56'E). It covers an area of 128 km² and has a mean depth of 7 m. It communicates, in the North, with the Mediterranean Sea by a 7-km long canal and, in the South, with the Ichkeul Lake by the Tinja River. The principal tributaries of this lagoon are the rivers Tinja, Mrezig, Garek, Ben Hassine and Gueniche. Five sampling stations were selected in the present work (Figure III.1) on the basis of concentrations of major classes of organic pollutants determined in previous studies (Barhoumi et al. 2013, 2014). Also, these stations were chosen as representative of the different anthropic pressures present in the study area (cement works, metallurgical industry, boatyard, tyre production factories, agriculture...). Both stations S1 (37°15.682'N, 9°51.540'E) and S2 (37°13.046'N, 9°52.604'E) receive discharges from urban runoff and

sewerage; while the station S1 additionally receives industrial effluents from the cement factory. Station S3 ($37^{\circ}11.238'N$, $9^{\circ}47.300'E$), is influenced by the waters inputs from Ichkeul lake and passage of commercial cargo boats between the city of Bizerte and Menzel Bourguiba. The station S4 ($37^{\circ}10.175'N$, $9^{\circ}49.375'E$), is situated in the Northwestern part of the lagoon and receives industrial effluents from the steel complex "El Fouledh". Lastly, the station S5 ($37^{\circ}08.537'N$, $9^{\circ}49.434'E$), is considered as being far from pollution sources but influenced by agricultural inputs.

An artificial reference sediment was used as a negative control during the medaka embryo-larval sediment contact assay. Sediment composition includes 92.5 % dw of 0.2-0.5 mm silica, 5 % dw clay and 2.5 % dw *Sphagnum* blond peat. More details on the preparation of this artificial sediment are reported in Le Bihanic et al. (2014).

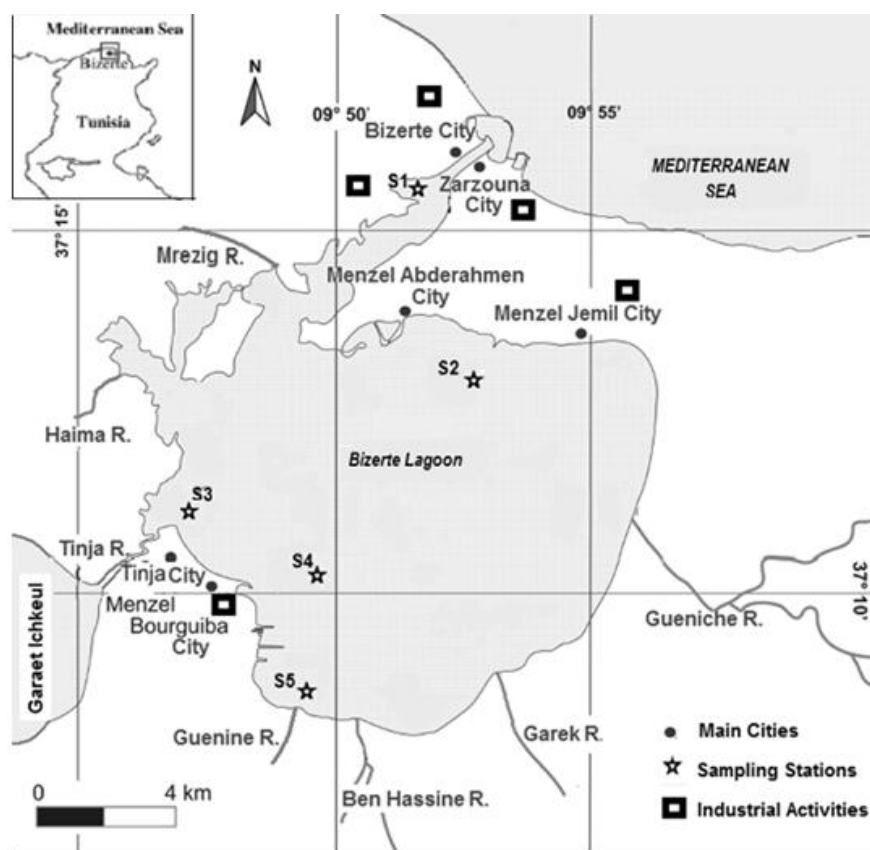


Figure III.1 Map of study area with location of sampling stations.

III.2.2 Sample collection

For the present study, five sampling stations within the lagoon were collected in March 2011 for evaluation. Using a stainless steel grab sampler, the superficial layer (0–10 cm) of sediment from all five sites was collected. After collection, samples were packed in

aluminium boxes and cool transported to the laboratory where they were immediately stored in a freezer at -20 °C. All sediment samples were freeze-dried, then sieved using a 2-mm mesh to eliminate debris, homogenized and stored at 4 °C prior to being used in the bioassays and chemical analysis.

III.2.3 Physico-chemical characterisation of sediments

All sampling stations were subjected to physical and chemical analyses in order to determine their natural characteristics (Table III.1). The percentage of the finer grain size fraction (<63 µm) of each sediment sample was determined gravimetrically after wet sieving (Savinov et al. 2000). Total organic carbon (TOC) content was determined by combustion in an LECO CS 125 analyzer (Etcheber et al. 2007). Dried and homogenized sediment samples were acidified in crucibles with 2 N HCl to destroy carbonates, then dried at 60 °C to remove inorganic C and most of the remaining acid residues and water. Analyses were performed by direct combustion in an induction furnace, and the CO₂ formed was determined quantitatively by infrared absorption. TOC contents are expressed as a percentage of dw of sediment. The ammonium (NH₄) was measured in sediment samples using colorimetric procedures (Strickland and Parsons 1972). The detailed analytical procedure was presented by Vicquelin et al. (2011). A comprehensive chemical analysis was conducted on all sites. For the POPs analysis (PAHs, PCBs, OCPs), sediments were freeze-dried, homogenised and extracted with an Accelerated Solvent Extraction system (ASE) using Dichloromethane (DCM). Details of the steps involved in the extraction, cleanup and analysis of POPs are described in Barhoumi et al. (2013, b). PAH identification and quantification were carried out using an analytical HPLC unit (Jasco, Japan) equipped with a Jasco PU-2089 HPLC pump, a type 7125 Rheodyne injector (with a 20 µL loop) and a fluorescence detector (FP-2020) with excitation and emission wavelengths that can be varied throughout the analysis. Separation and detection of PCBs and OCPs were performed by high-resolution gas chromatography (GC; Agilent 6890 Series gas chromatography system; Agilent Technologies, Philadelphia, PA, USA) equipped with a ⁶³Ni electron capture detector, and both PTE-5 (30 m×0.32 mm i.d., 0.32-µm film thickness) and HP1 (30 m×0.32 mm i.d., 0.25-µm filmthickness) capillary columns were used. Quality control (QC) for all analyses was evaluated by the use of appropriate laboratory and/or certified reference materials with individual analytical batches. Additional QC criteria including analysis of blanks, assessment of duplicate sample analysis and repeat analysis were also included on a per batch basis performed.

For the determination of heavy metals, freeze-dried sediments (0.5 g dw) were digested with 70% nitric acid for 2 h at 100 °C. After digestion, the sample volumes were made up to 25 mL with MilliQ water. Eight metals including Ag, Co, Ni, As, Cd, Pb, Cu and Zn were measured by ICP-MS (HP 4500 Series, Agilent Technologies, Willmington, DE, USA), using external calibration. A 1 g L⁻¹ multi-elemental solution was used to prepare the standard solutions. Rhodium was used as an internal standard to evaluate the instrumental drift. The accuracy of the determination procedure was assessed by analysis of the standard reference PACS2 (NRCC, CNRC, marine sediment). The concentrations measured for the reference sediment were in agreement with the certified values.

III.2.4 Sample preparation

Sediment toxicity was measured on three different fractions using the Medaka embryo-larval assay by sediment contact (MELAc), Microtox[®] and SOS Chromotest (Figure III.2).

Table III.1 Physico-chemical composition of the fine (<2 mm) sediment fraction for the five sampling stations.

	S1	S2	S3	S4	S5	ERL ^a	ERM ^a
Fine particle (<63 µm) (%)	52.2	50.1	69.3	91.5	32.1		
TOC (%)	3.9	0.8	1.9	1.3	1.0		
NH ₄ (µM)	72.0	108.0	113.0	162.0	20.0		
Metals (µg g ⁻¹ dw)							
Ag	10.1	12.2	14.0	21.6	16.8	1.0	3.7
As	21.2	11.2	12.1	11.7	9.9	8.2	70.0
Cd	0.7	0.2	0.5	0.4	0.3	1.2	9.6
Co	4.7	5.6	8.0	8.4	3.7	-	-
Cu	35.5	10.9	21.0	18.5	11.9	34.0	270.0
Ni	16.4	10.3	18.7	18.9	6.5	20.9	51.6
Pb	55.2	26.3	43.9	56.8	36.4	46.7	218.0
Zn	182.3	85.7	142.2	169.1	151.0	150.0	410.0
ΣMetals	326.0	162.3	261.0	305.5	236.5		
Organic contaminants (ng g ⁻¹ dw)							
Σ14-PAHs ^b	394.1	60.8	39.7	79.4	55.8		
Σ9-PAHs _{mut} ^c	276.1	43.7	29.9	65.9	47.8		
Σ5-PAHs _{car} ^d	120.8	21.1	12.0	28.1	22.0		
Σ12-PCBs ^e	14.6	0.8	3.9	3.8	5.2		
Σ4-OCPs ^f	14.0	2.2	3.2	2.0	1.0		

^a Values taken from Long et al. (1995)

^{b,c,d} Values taken from Barhoumi et al. (2014)

^{e,f} Values taken from Barhoumi et al. (2013)

^b Σ = naphthalene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenzo[a,h]anthracene and benzo[g,h,i]perylene

^c Sum of mutagenic PAHs: Phe, Flu, BaA, Chr, BbF, BkF, BaP, DahA and BgP

^d Sum of carcinogenic PAHs: BaA, BbF, BkF, BaP and DahA

^e Σ = Congeners 28+31, 52, 44, 101, 149, 118, 153, 138, 180, 194, 209

^f Σ = HCB, p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD

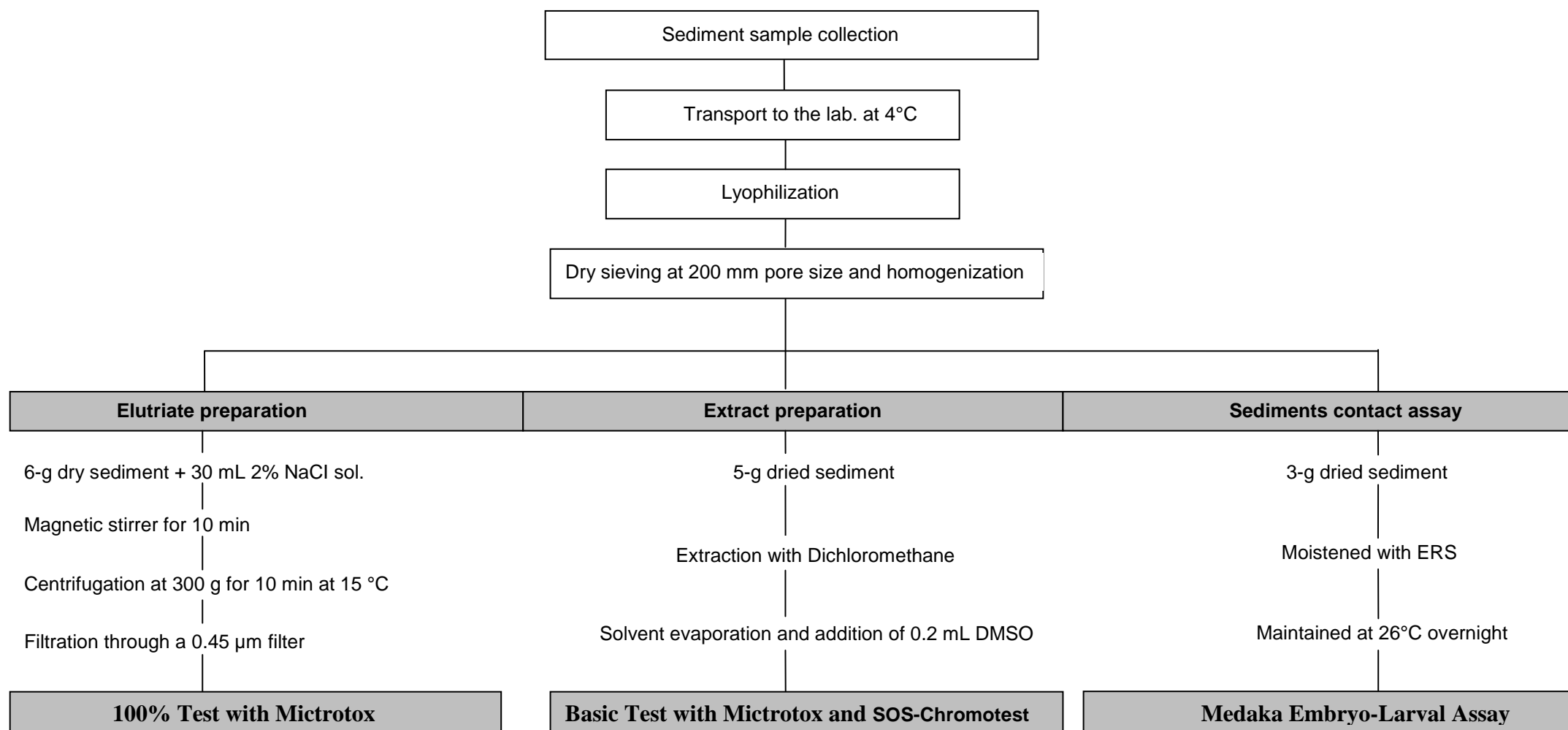


Figure III.2 Schematic procedure for sediment sample preparation.

III.2.4.1 Elutriate

The protocol applied for sediment elutriate preparation (water-extractable phase) was a derivation of Environment Canada (1992): 30 mL 2% NaCl solution was added to 6 g dry weight sediment. The sediment-water suspension was agitated vigorously on a magnetic stirrer for 15 min and centrifuged at 300 g for 10 min at 15 °C. The supernatant was collected as elutriate and pH was measured following filtration through a 0.45 µm filter. The elutriate was stored at 4 °C in the dark prior to toxicity testing (Microtox[®] Acute Toxicity 100% Test), which was conducted within 24 h of preparation.

III.2.4.2 Organic extract

For the preparation of organic extracts, 5 g freeze-dried sediment from each of the five sampling stations was separately extracted with dichloromethane (Fluka, Buchs, Switzerland) using an ASE 200 accelerated solvent extractor (Dionex, France). The parameters used during the extraction procedure were as follows: temperature (100 °C), static time (8 min), pressure (100 bars), heating time (5 min), flush volume (60 %), and purge time (60 s). The volume of the resulting Dichloromethane-dissolved extract was reduced by using a RapidVap evaporator (Labconco, Kansas City, MO, USA). Extracts were concentrated to dryness with N₂ and resuspended in 200 µL of dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma). A blank of extraction was prepared by the same procedure but without sediment.

III.2.4.3 Solide-phase sediment

For each studied sediment including control sediment and the five sampled stations, 3 g of freeze-dried sediment was laid in a 35 mm-diameter plastic Petri dish and moistened with 2 mL egg rearing solution (ERS: NaCl 85.6 mM, KCl 0.4 mM, CaCl₂ 0.4 mM and MgSO₄ 1.4 mM, pH 7), then maintained at 26°C overnight before the beginning of the experiment. A Nitex mesh (mesh opening 1000 µm, Sefar Filtration Inc., Depew, NY, USA), was laid onto the sediment to avoid egg sinking into the sediment.

III.2.5 Bioassay conditions

III.2.5.1 Microtox[®]

Two Microtox[®] protocols were applied for sediment acute toxicity testing; the 100% Test on sediment aqueous extract (Elutriate), and the Basic Test on sediment organic extracts.

Microtox[®] is a commercial toxicity bioassay based on the reduction in bioluminescence of the marine bacterium *Vibrio fischeri* following exposure to toxicants. Both the Microtox

100% Test and the Microtox Basic Test were used following the standard procedures and manufacturer's protocols (AZUR Environmental 1998; ISO 1999). These toxicity tests were conducted with a Model 500 analyzer (Kontron Instruments, Montigny le Bretonneux) and lyophilized bacteria cultures (Acute Reagent, Modern Water, Guildford, UK). A basic test was conducted with the reference standard potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) for each fresh vial of bacteria opened to ensure validity of test method. The Microtox[®] data acquisition software was used to calculate the EC50 (%) value, the effective concentration of sample (expressed as mg of dw sediment) causing a 50% decrease in the light output.

The 100% Microtox Test was performed on four serial 1:2 dilutions of elutriate. Each serial dilution was then inoculated with 10 µl of freshly resuspended freeze-dried bacteria. Emission of light from the bacteria after 5, 15 and 30 min exposure was recorded and compared with blank (NaCl 2%), and corrected for spontaneous decline in photoactivity.

The Microtox[®] Basic Test was performed on five serial 1:2 dilutions of sediment extracts. Briefly, 0.5 mL of sediment extract solution (20 µl organic extract in 2 ml saline solution) was added to 0.5 ml of bacteria suspension. This solution was used as a starting point for additional 1:2 serial dilutions of each sample. After 5, 15 and 30 min incubation, the bioluminescence was measured, compared with a blank, and corrected for spontaneous decline in photoactivity. Routinely, 5 concentrations of extracts and the saline blank were tested in duplicate.

III.2.5.2 SOS-Chromotest

For detection of direct and indirect acting genotoxins in sediment organic extracts the SOS-Chromotest (Quillardet and Hofnung 1985) was performed using *Escherichia coli* PQ37 strain with and without addition of an S9 microsomal fraction obtained from the livers of Sprague-Dawley rats treated with β -naphthoflavone and phenobarbital (Xenotech). In each series of tests, a solvent control (3% v/v DMSO) and a B[a]P positive control ($0.5 \mu g mL^{-1}$) were added. A blank of extraction was added to each series of samples, to check that the extraction procedure did not itself result in any genotoxicity. Responses were expressed as mean induction factor (IF) per gram of dw sediment for three replicates. Samples with significant SOS induction factor compare to control solvent were considered as genotoxic when values exceeded 2, moderately genotoxic when values were in the range 1.5–2.0, and slightly genotoxic when it was comprised between 1.0 and 1.5 (Mersch-Sundermann et al. 1992).

III.2.5.3 Medaka embryo-larval assay

Toxicity of the studied sediments was evaluated by the Medaka Embryo-Larval Assay by direct sediment-contact exposure (Vicquelin et al., 2011, Barjhoux et al., 2012). Fertilised eggs of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) were received from supplier (GIS AMAGEN, Gif-sur-Yvette, France) at 24 h post fertilisation (hpf). Embryos (15 per replicate and three replicates per treatment) were laid onto the grid at the sediment surface and covered with a thin layer of ERS buffer (2 mL). The buffer was changed every day. Exposures were performed in a climate cabinet (Snijders Scientific, Netherlands) at 26 ± 0.3 °C under a 12 h:12 h light:dark cycle with lighting at 5000 lx. Each embryo was examined daily under dissecting microscope for the stage of development, appearance of visible lesions, and death record. Dead embryos were systematically removed. Also, dissolved oxygen was measured daily at the sediment-water interface for the whole duration of the embryo exposure using a Clark-type sensor equipped with a guard cathode (Unisense, Aarhus, DK) and connected to a high sensitivity picoammeter (PA2000, Unisense). More details on Oxygen monitoring are mentioned by Vicquelin et al. (2011). Exposure was stopped at hatching peak (between 8 and 10 days at 26 °C). Newly hatched larvae were placed in 40 mL dechlorinated water (1/3 v/v tap water and osmosed water, temp. 26 °C, pH 7.5, cond. 180 µS, hardness 53 mg/L CaCO₃) and daily observed until complete resorption of vitellus (currently 3 to 4 additional days). Unhatched embryos were placed in clean Petri dishes filled with 3 mL ERS until hatching and then transferred to dechlorinated water.

Several acute and sub-acute endpoints were measured on embryos or pro-larvae including viability, cardiac activity, morphological abnormalities, time to hatch and hatching success.

Viability was checked daily at embryonic and larval stages, during the whole experiment (day 1 to 24 pf). Dead embryos (whitish opaque appearance or absence of cardiac contraction after 3 dpf) were counted and removed from each replicate.

Cardiac activity was assessed at day 10 pf in five randomly selected embryos per replicate. Heart beats were counted in three 20s-intervals per individual using Leica MZ75 stereomicroscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) and a cold light source (Intraluxs 4100, Volpi AG, Schlieren, Switzerland). Room temperature was maintained at 23 ± 1 °C. These three measurements were then added to obtain cardiac activity in beats per minute. The five individual measurements were finally averaged to determine the mean cardiac activity for a replicate.

Time to hatch and hatching success were checked daily from the day of first hatching to the end of the experiment at day 24 pf. Only embryos able to fully exit chorions were considered as ‘hatched’, others were counted as ‘not hatched’. Successfully hatched larvae were taken into account for time to hatch determination, noting the date of hatching and considering that the day of fertilisation was day 0.

Developmental abnormalities were observed every day on each newly hatched larva using Leica MZ75 stereomicroscope and photographed by a CCD camera (Leica DFP420C). Five different categories of abnormalities were recorded including: oedemas (pericardial, perivitelline, cranial); axial skeletal deformities (body axis, scoliosis, lordosis); Craniofacial deformities (skull and jaw deformities); Cardio-vascular anomalies (haemorrhage, anaemia) and Eye anomalies (hyper- hypo- or dystrophia, pigmentation alteration, hypopigmentation, absence of eye).

III.2.6 Statistical analysis

Bioassay measurement endpoints (except Microtox[®]) were expressed as mean \pm standard deviation (SD). All statistical analysis was performed using the software STATISTICA 7.1 from StatSoft (Maison Alfort, France). Results were initially tested for normality (Shapiro–Wilk test on residues with 1% risk) and equality of variance (Levene test, 5% risk). If conditions of use were respected, significant differences between treatments were tested with one way ANOVA analysis followed by post-hoc Tukey test ($p < 0.05$). If data transformation was not sufficient to perform parametric analysis, non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA and its post-hoc test (analogous to Bonferroni–Dunn’s test) were used ($p < 0.05$). The existence and strength of relationships between parameters were determined by parametric Pearson’s bivariate correlation analysis. Principal component analysis (PCA) was used to obtain an overview of the spatial distribution pattern of the different studied parameters and to assess the relative implication of these different parameters in among site differences.

III.3 Results

III.3.1 Sediment chemistry

The physico-chemical characteristics of studied sediments are presented in Table III.1. Total organic carbon concentrations were relatively uniform between stations (0.8–1.9%) except S1 that shows the highest content of TOC (3.9 %). The percentage of fine particles ($< 63 \mu\text{m}$) and the concentration of ammonium (NH_4) were both highest at S4 and lowest at S5 station.

Comprehensive chemical analysis was conducted on sediments to assist in the interpretation of any observed toxicity (Table III.1). The highest concentrations of organic micropollutants (Σ PAHs, Σ PCBs and Σ OCPs) were measured at the S1 station (Barhoumi et al. 2013, 2014). The S1 station was also shown to have the highest concentrations of As, Cd, Cu and Zn. In contrast, levels of Ag, Co, Ni and Pb were found to be relatively comparable over the different studied stations.

Concentrations of chemicals were compared to the effects range low (ERL) and effects range median (ERM) criteria for evaluation of sediment contamination in marine and estuarine environments (Long et al. 1995). In this study, no chemicals levels exceeded ERM criteria (except Ag), but the heavy metal analytes As, Cu, Pb, and Zn were higher than ERL level. Also, Acenaphthene and Fluorene, in station S1 were above ERL level (Barhoumi et al. 2014). For organochlorines, the concentrations of Σ DDTs and p,p'-DDT were above than ERL and ERM, respectively. The Σ PCBs concentration was lower than the sediment quality guidelines (Barhoumi et al. 2013). Thus, chemical compounds in sediments in the Bizerte lagoon may potentially have adverse effects on aquatic organisms. As a result, it was necessary to assess the ecotoxicity of sediment to organisms.

III.3.2 Sediment extract acute toxicity

We applied the Microtox[®] Basic Test to evaluate the toxicity of sediment organic extracts from the five sampling stations. In the concentration range tested (from 25 to $25 \cdot 10^{-5}$ g dw equivalent sediment), all sediment organic extracts were very toxic to *V. fischeri* strain and caused 100% inhibition of bioluminescence (data not shown). The Microtox 100% test was also used to evaluate the toxicity of sediment aqueous extracts (Elutriate). The results expressed as milligrams dry weight of sediment are presented in Table III.2. The most toxic sediment aqueous extracts was collected from station S3 with 30 min-EC50 value of 80.6 mg dw sediment mL⁻¹. The least toxic sample was collected from station S2 with a maximal inhibition in bioluminescence of 2.9%. Exposure to the S1, S4 and S5 sediment aqueous extracts resulted in a maximal bioluminescence inhibition of 52.9%, 53.2% and 9.7% after 30 min exposure, respectively. In contrast to S1, S3 and S4 which shows an increase in toxicity with increase exposure time, the S2 and S5 elutriates did not show time-dependent increase/decrease in toxicity. Based on the results of inhibition, the toxicity gradient decreases in the following order: S3>S4=S1>S5=S2.

Table III.2 Toxicity (mg mL⁻¹) of elutriates of sediments collected from five stations of the Bizerte lagoon and measured with the Microtox® assay.

Station	Exposure time (min)	Percentage of inhibition (%) ^a	EC ₅₀ ^b (mg mL ⁻¹)
S1	5	24.6	>200
	15	14.3	>200
	30	52.9	179.7 (146.6-220.1)
S2	5	2.9	>200
	15	0.5	>200
	30	0.7	>200
S3	5	54.6	>200
	15	67.0	>200
	30	76.7	80.6 (63.51-102.3)
S4	5	31.3	>200
	15	42.8	>200
	30	53.2	186.9 (162.1-215.4)
S5	5	2.3	>200
	15	0.5	>200
	30	9.7	>200

^a At the highest tested concentration of 200 mg equivalent dry sediment per mL⁻¹

^b EC₅₀ values and corresponding 95% confidence intervals in parentheses

III.3.3 Sediment extract genotoxic potency

Genotoxicity of sediment organic extracts were analysed by SOS Chromotest with and without S9 metabolic activation system for detection of indirect and direct acting genotoxicants, respectively. No significant differences were observed between the five sampled stations (with and without S9) ($P > 0.05$). Sediments extract from station S1 was found to be more genotoxic (moderately genotoxic) than those from remaining stations with an IF of 1.95 ± 0.12 . Also, S1 was significantly different from the solvent control and blank of extraction ($P < 0.05$) (Figure III.3). For significant SOS Chromotest response (in comparison to the blank of extraction) samples are considered genotoxic for $IF > 2$, moderately genotoxic for $1.5 < IF \leq 2$ and slightly genotoxic for $1.0 < IF \leq 1.5$. Hence, sediment extract from S1 was moderately genotoxic, from S2, S3 and S4 slightly genotoxic and no genotoxic from S5. The genotoxicity of sediment extracts was likely related to pro-genotoxicants, since no genotoxic response was obtained without addition of an S9 microsomal fraction (data not shown).

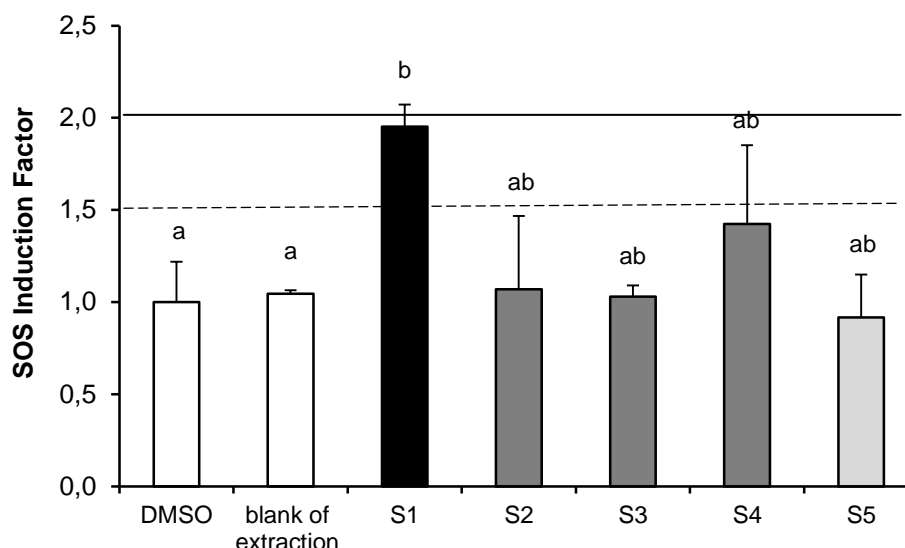


Figure III.3 Genotoxicity of organic extracts from sediments collected in the Bizerte lagoon. Analyses were performed using the SOS Chromotest with an S9 microsomal fraction (Quillardet and Hofnung 1985). The amount of organic extracts was 0.025 g dw equivalent sediment. The values are mean induction factors \pm S.D. for three replicates.

III.3.4 Whole sediment Embryo-larval toxicity assay

Dissolved oxygen level was measured daily for the whole duration of embryo exposure to sediments (10 days). It varied from $74.5 \pm 1.3\%$ at S3 to $79.8 \pm 1.5\%$ at S2 (Figure III.4).

Baseline embryonic and larval viability in the control group were $71.9 \pm 14.2\%$ and $97.8\% \pm 3.8\%$, respectively (Figure III.5). Viability for sediment-exposed fish ranged from $86.1 \pm 6.6\%$ (station S5) to $92.0 \pm 8.0\%$ (stations S3 and S4) at the embryonic stage (Figure III.5A) and from $90.2 \pm 13.4\%$ (station S5) to 100% (station S2) at the larval stage (Figure III.5B). No significant difference was detected between stations.

The cumulative viability at 20 days post-fertilisation (dpf) in the five sediments (S1, S2, S3, S4 and S5) varied from $67.8 \pm 12.1\%$ (station S1) to $92.0 \pm 8.0\%$ (station S4) and shows no significant difference compared to the control group (Figure III.5C). However, the cumulative viability of Medaka for S2 and S4 conditions was significantly higher than for S1.

The hatching rate was $9.9 \pm 5.5\%$ at 9 dpf and reaches $84.8 \pm 5.1\%$ at 12 dpf in the control group. After sediment-exposure, embryos exhibited hatching delay (Figure III.6A). At 20 dpf, the hatching rate was reduced in four stations (S1, S3, S4 and S5) compared to the control (but not significant). It varied between $60.9 \pm 15.1\%$ at S1 and $82.7 \pm 14.0\%$ at S3 (Figure III.6A).

Embryonic developmental time, corresponding to the time to hatch, was significantly affected after exposure to sediments. Mean time to hatch at 20 dpf varied from $14.1 \pm 1.0\%$

(station S2) to $17.7 \pm 0.4\%$ (station S3) and were significantly higher than the control group ($10.4 \pm 0.4\%$) (Figure III.6B). Moreover, Mean time to hatch of the Medaka in S3, S4, and S5 conditions were significantly higher than those in S2. Also, hatching time in S3 was significantly higher than S1 and S2.

No significant difference was found in the average cardiac activity at 10 dpf between the control group and embryos exposed to sediments of the Bizerte lagoon (Fig. 7). However, a significant difference was observed between stations S1 and S3 (87.3 and 104.6 beats/min on average, respectively, Figure III.7).

Morphological abnormalities in medaka larvae were recorded at hatching for each individual and summarized in Table III.3. Percentages of malformed larvae in control group were around 17%. After sediment-exposure, larval deformities at stations S1 and S5 were statistically different from the control group ($P < 0.05$). If we compare each type of malformation at all stations, the results show that, except axial skeleton deformities, the remaining morphological abnormalities (oedema, cranio-facial, cardio-vascular and eye anomalies) were generally of a low occurrence in control group, but tend to increase albeit non significant with sediment exposure. The most frequently observed abnormalities were axial skeleton deformities and cranio-facial deformities with a percentage ranging from 51.1 ± 9.4 to $67.4 \pm 16.7\%$ and of 19.6 ± 2.3 to $27.6 \pm 8.6\%$, respectively according to station. Oedema, cardio-vascular anomalies and eye anomalies were also detected but with a low percentage. Now, if we compare all malformations (oedema, Axial Skeletal deformities, cranio-facial, cardio-vascular and eye anomalies) for each site, the results show that, axial skeletal deformities are significantly different from the oedema and the eye anomalies at S1 ($p < 0.01$), S4 ($p < 0.001$) and S5 ($p < 0.05$) stations. Also, at S5 the cranio-facial deformities are significantly different from eye anomalies, and the axial skeletal deformities are significantly different from cardio-vascular anomalies (Table III.3). Some representative larval abnormalities are illustrated in Figure III.8.

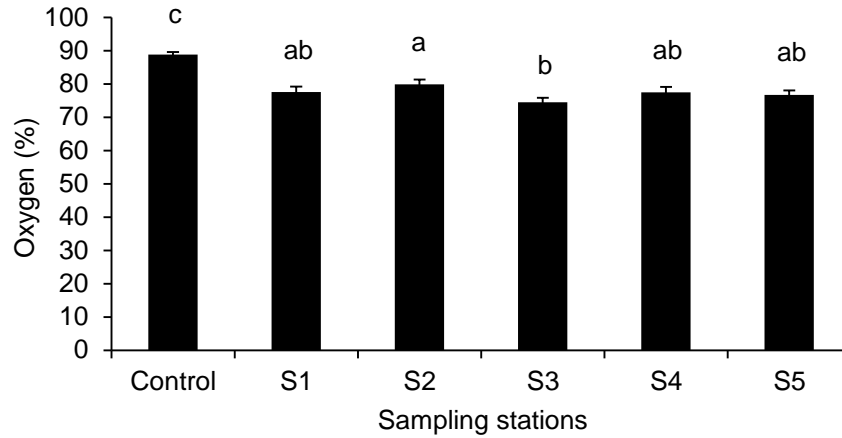


Figure III.4 Mean dissolved oxygen measured at the water-sediment interface over the 10-days of the MELAc assay for sediments collected from five stations of the Bizerte lagoon. The data shown correspond to mean percentages of three independent replicates \pm S.D. Each replicate is the mean of ten daily measurements. Stations with different letter are significantly different ($P < 0.05$).

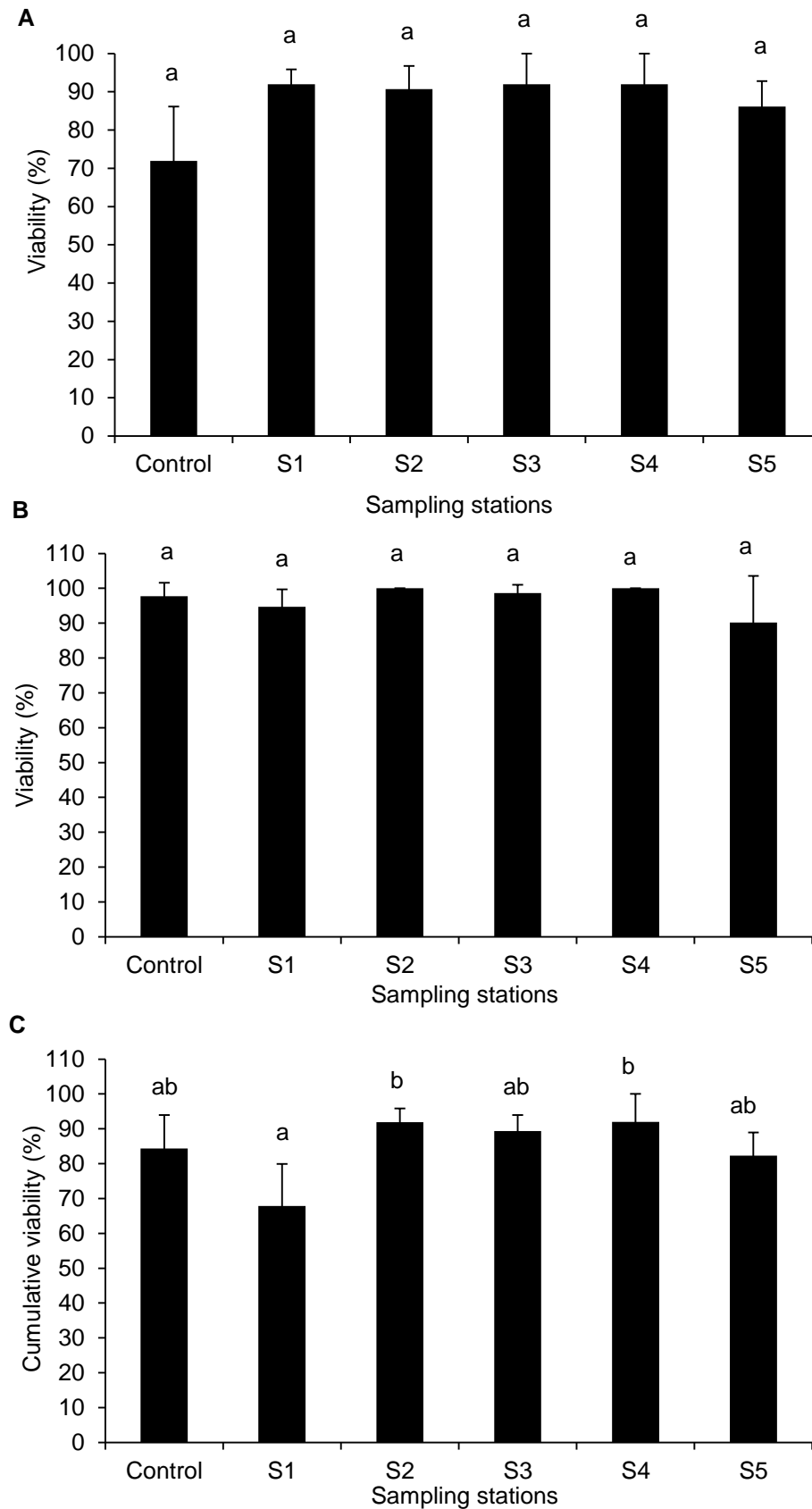


Figure III.5 Embryonic (A), larval (B) and cumulative viabilities (C) of medaka embryos after exposure to the superficial sediments of the Bizerte lagoon for 20 days. The data shown correspond to mean percentages of three independent replicates \pm S.D. Stations with different letter are significantly different ($P < 0.05$).

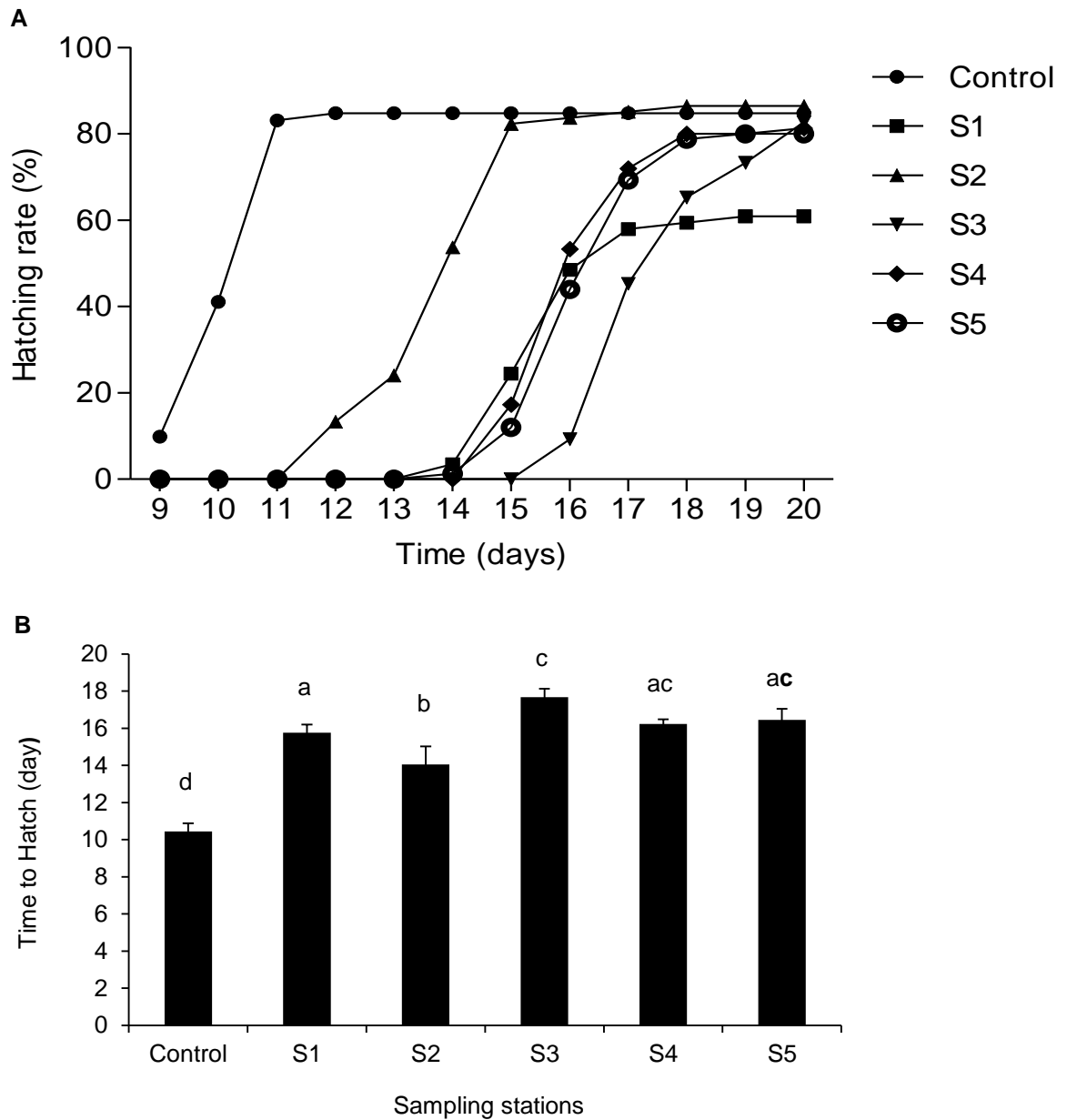


Figure III.6 Hatching rate (A) and time to hatch (B) of medaka embryos exposed for 20 days to superficial sediments from five stations of the Bizerte lagoon. The data shown correspond to mean percentages of three independent replicates \pm S.D. Stations with different letter are significantly different ($P < 0.05$).

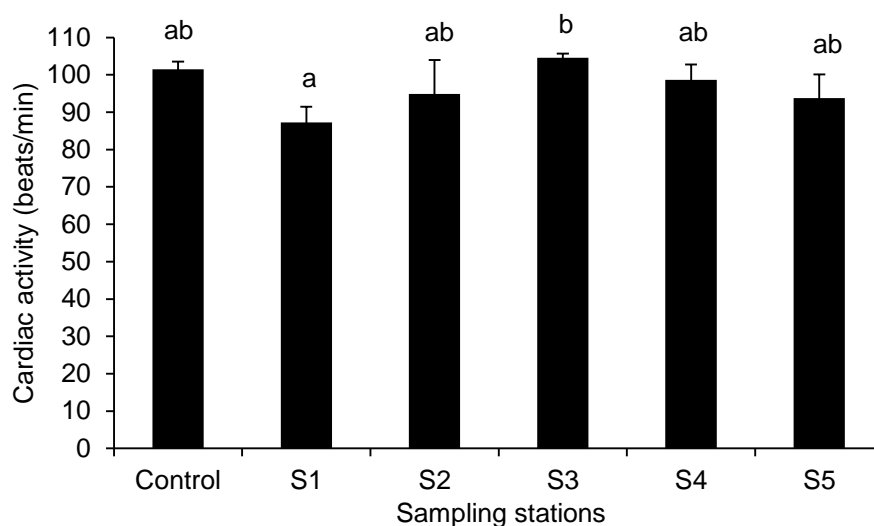


Figure III.7 Cardiac activity measured in 10 dpf-embryos following exposure to superficial sediments from five stations of the Bizerte lagoon. Values represent the mean response (\pm SD) from three replicates. Stations with different letter are significantly different ($P < 0.05$).

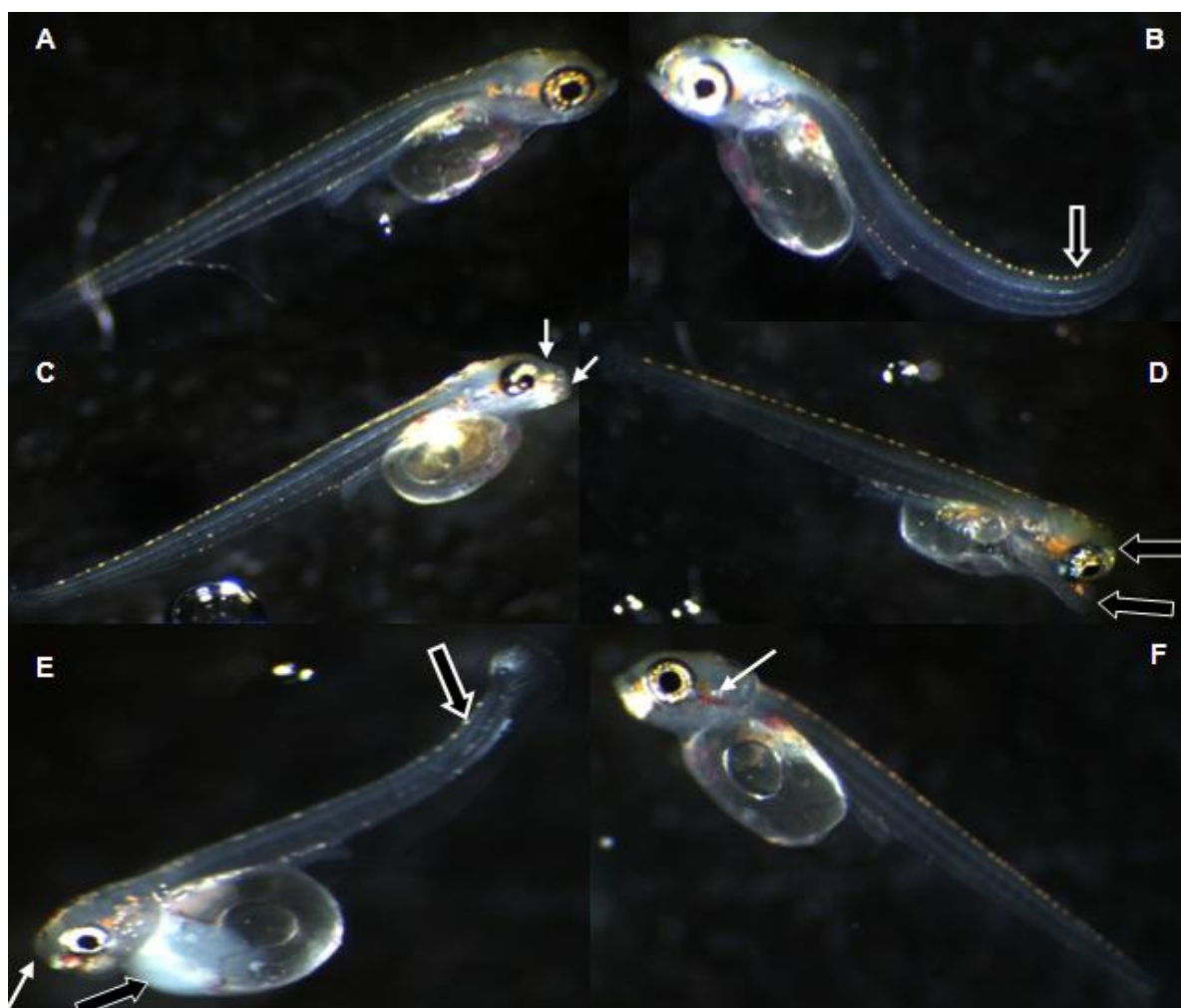


Figure III.8 Photographs of major abnormalities observed in Japanese medaka larvae following embryo exposure to sediments collected from five stations in the Bizerte lagoon (A) Normal larva, (B) larva showing lordosis, (C, D) individuals with skull and jaw deformities (E) individual with cranio-facial deformations, pericardial oedema and abnormal curvature of tail, (F) larva showing haemorrhage.

Table III.3 Larval abnormalities following exposure of medaka embryos to superficial sediments from five stations of the Bizerte lagoon. Results are expressed in percentage of impaired larvae among overall hatched individuals. Data are mentioned as mean \pm SD (N=3)*.

	Malformed larvae	Oedema	Axial Skeletal deformities	Cranio-facial deformities	Cardio-vascular anomalies	Eye anomalies
Control	17.1 \pm 9.0 ^a	0.0 \pm 0.0	88.9 \pm 19.2	11.1 \pm 19.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
S1	69.3 \pm 13.2 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	67.4 \pm 16.7 ^a	25.0 \pm 25.0 ^{ab}	7.6 \pm 8.4 ^{ab}	0.0 \pm 0.0 ^b
S2	33.3 \pm 17.6 ^{ab}	11.1 \pm 19.2	59.2 \pm 22.6	21.6 \pm 4.4	5.6 \pm 9.6	2.6 \pm 4.4
S3	49.8 \pm 14.6 ^{ab}	12.6 \pm 11.9	51.1 \pm 9.4	19.6 \pm 2.3	7.3 \pm 3.4	9.4 \pm 11.5
S4	37.8 \pm 16.8 ^{ab}	2.4 \pm 4.1 ^b	54.2 \pm 3.8 ^a	26.6 \pm 6.1 ^{ab}	6.1 \pm 5.6 ^{ab}	10.7 \pm 12.9 ^b
S5	58.1 \pm 10.7 ^b	3.7 \pm 6.4 ^{bc}	60.6 \pm 9.8 ^a	27.6 \pm 8.6 ^{ab}	6.3 \pm 5.7 ^{bc}	1.9 \pm 3.2 ^c

Means with different letters are significantly different (p<0.05) according to the results of one-way ANOVA followed by Tukey's test

III.3.5 Multivariate analysis

Principal component analysis (PCA) based on chemical (Σ Metals, Σ PAHs, Σ PCBs, Σ OCPs), physico-chemical (Fine particles $<63\ \mu\text{m}$, TOC, NH_4) and biological (Microtox[®], SOS Chromotest, cumulative viabilities, hatching rate, cardiac activity, malformed larvae) endpoints gave a principal component (PC1) accounting for 66.20% of the variability amongst the data (Figure III.9A). This PC was loaded most negatively (to the left) by hatching rate, cumulative viabilities and cardiac activity and loaded to the right by metals, PAHs, PCBs, OCPs, TOC content, Malformed larvae and SOS Chromotest. The second PC (PC2) accounted for 25.19% of the variability in the data and was negatively loaded only by NH_4 , fine particles $<63\ \mu\text{m}$ and Microtox[®] (Figure III.9A). Variables with a low ability to discriminate between sites such as individual concentration of metals, embryonic viabilities, larval viabilities, oedema, axial skeletal deformities, cardio-vascular anomalies, cranio-facial deformities and eye anomalies were excluded from PCA. The plot of scores for different sites for the two principal components PC1 and PC2 separated three groups of sites (Figure III.9B). S2 and S5 (First group), S3 and S4 (Second group) and the third group (S1).

The significant relationship between variables was further studied by means of a correlation matrix. In Table III.4, the correlation coefficients between variables and biological endpoints are given. Bioluminescence of marine bacteria in the Microtox[®] bioassay was positively correlated to the levels of Σ Metals ($r=0.899$). The SOS Chromotest bioassay was also correlated to the levels of Σ PAHs ($r=0.935$) and Σ OCPs ($r=0.905$). The cumulative viabilities were inversely correlated to Σ PAHs ($r=-0.905$) and Σ PCBs ($r=-0.962$). Hatching rate was negatively correlated with chemical concentrations (Σ PAHs, $r=-0.967$; Σ PCBs, $r=-0.995$; Σ OCPs, $r=-0.948$) and TOC content ($r=-0.939$). Lastly, malformed larvae was positively correlated to the levels of Σ PCBs ($r=-0.883$).

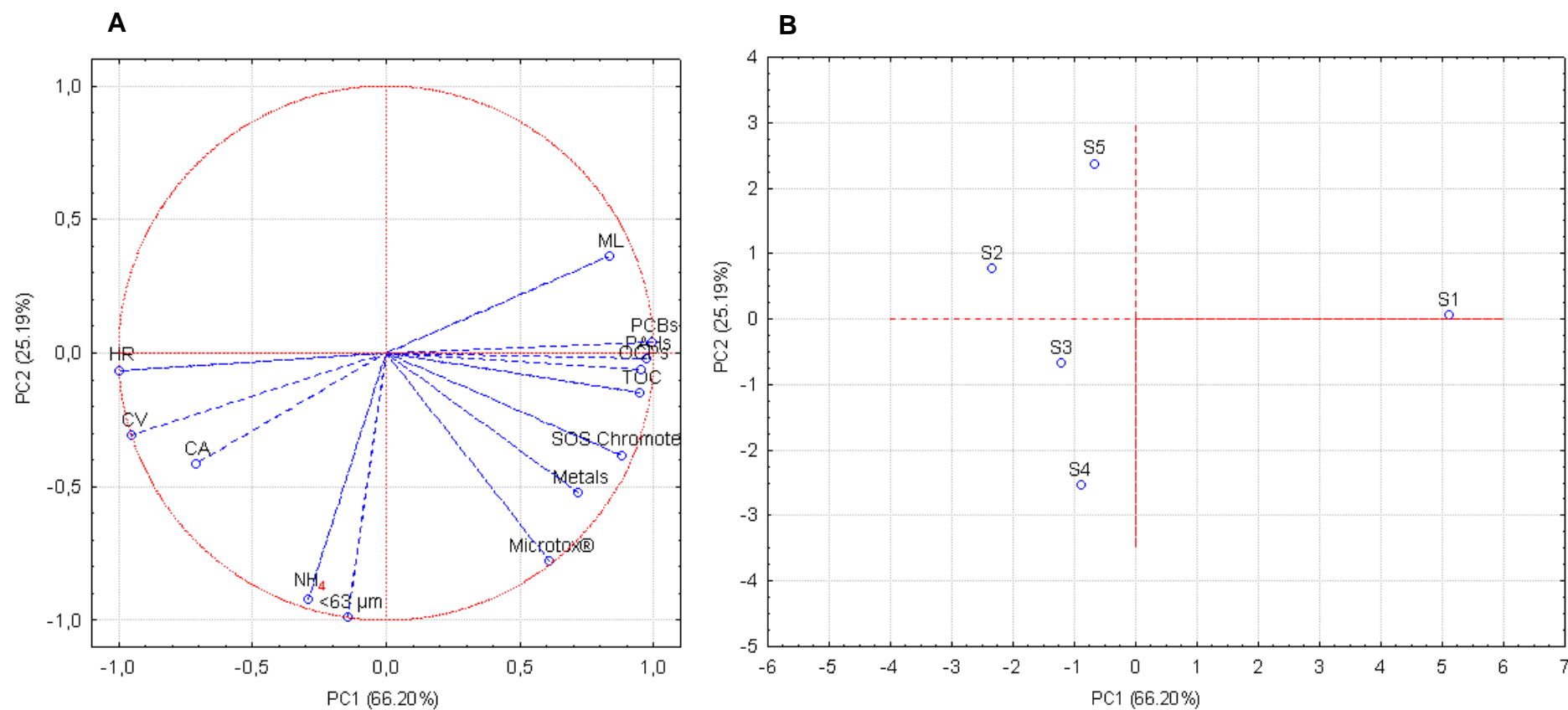


Figure III.9 Results of the PCA of the two principal components produced by chemical (Σ Metals, Σ PAHs, Σ PCBs, Σ OCs), physico-chemical (fine particles <63 µm, TOC, NH₄) and biological (Microtox®, SOS Chromotest, CV (Cumulative viabilities), HR (Hatching rate), CA (Cardiac activity), ML (Malformed larvae)) endpoints in sediments collected at five stations in the Bizerte lagoon. (A) Plot of variable vectors. (B) Plot of scores of different sites.

Table III.4 Pearson correlation coefficients between chemical, physico-chemical variables and biological endpoints.

	ΣMetals	ΣPAHs	ΣPCBs	ΣOCPs	<63 µm	TOC	NH ₄	Microtox®	SOS Chromotest
Microtox®	0.899*	0.588	0.579	0.579	0.687	0.652	0.507	1	0.792
SOS Chromotest	0.694	0.935*	0.831	0.905*	0.199	0.855	0.134	0.792	1
Cumulative viabilities	-0.543	-0.905*	-0.962**	-0.877	0.436	-0.856	0.572	-0.342	-0.714
Hatching rate	-0.681	-0.967**	-0.995***	-0.948**	0.208	-0.939**	0.352	0.553	-0.853
Time to hatch	0.522	-0.145	0.143	-0.058	0.270	0.189	-0.022	0.253	-0.176
Cardiac activity	-0.173	-0.773	-0.683	-0.658	0.532	-0.496	0.509	-0.129	-0.645
Malformed larvae	0.570	0.709	0.883*	0.708	-0.454	0.768	-0.673	0.245	0.475

Numbers in bold indicate significant correlations. Asterisks indicate the signification of the correlations: *p<0.05; **p<0.01;

***p<0.001

III.4 Discussion

Marine sediments are generally the final repositories for municipal and industrial waste materials released into the marine environment. It is well recognized that the overall hazard assessment of sediment necessitates the use of an integrated approach, which considers contaminant concentrations in tandem with biological effects (Ahlf et al. 2002; Nendza 2002; Nipper et al. 2002). There is no universal toxicity assay that can reliably predict the potential hazards associated with contaminated sediments. A multitrophic battery of tests, which incorporates a number of different test species, is therefore advocated to reduce uncertainty in sediment quality assessment (Giesy and Hoke 1989; Bombardier and Bermingham 1999; Chapman et al. 2002). In addition, a test strategy, which includes the assessment of multiple exposure phases, to evaluate the potential toxicity exerted by both dissolved and particle-bound contaminants, affords a more thorough appraisal of potential sediment toxicity. Here we demonstrated the applicability of the Microtox[®] assay, SOS Chromotest assay and medaka embryo-larval assay (MELAc) to investigate the toxicity of different phases of sediments: elutriate, organic extract and whole sediment. The three tests allow evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and embryotoxicity and teratogenicity endpoints representing the advantage of being sensitive, inexpensive, reproducible, easy to conduct and ecologically relevant. To interpret any observed toxicity, chemical analysis were combined with toxicological analysis.

Elutriates prepared from sediments from the five sampled stations of the Bizerte lagoon exhibited slight to moderate toxicity in the Microtox[®] 100 % test. Indeed, no or a slight toxic response was observed following exposure of *V. fischeri* to elutriate extracted from the S2 and S5 sites (less than 10% bioluminescence inhibition). Moderate toxicity was measured for S4 and S1 elutriates with about 50% bioluminescence inhibition at 30 min exposure. This toxicity was more pronounced for S3 elutriate with rather 77% inhibition. However, no significant correlation was observed between all the metals determined (except Pb) and toxicity values. This poor correlation could be explained by the low metals bioavailability in aqueous extracts. Campbell et al. (1988) shows that the presence of organic matter increases the retention of metals by the formation of stable complexes between metal-clay-organic matter or metal-organic matter-clay. Significant correlations between organic matter and heavy metals have been identified by Ben Garali et al. (2013) in the Bizerte lagoon. If we consider the sum of the metals (Σ Metals) we observe that there are a significant positive correlation between Σ Metals and acute toxicity ($r=0.899$). It is possible that the observed correlation was due to synergistic interactions between the different metals (Walker et al. 1996).

No correlation was found between organic contaminants (PAHs, PCBs and OCPs) and acute toxicity ($p > 0.05$). The lack of correlation may be attributed to a number of factors. The compounds analyzed includes only 14 USEPA priority PAHs and 12 PCBs and 4 OCPs. Toxicity may have resulted from additional components and contaminants not analysed in the present study and the possible occurrence of synergistic or antagonistic interactions between constituents present in sediment. Indeed, organotin compounds were detected at high concentrations ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) in sediments from the same place where usually antifouling paints are used (Mzoughi et al. 2005). Stasinakis et al. (2001) noted an increase in inhibition of respiration rate of activated sludge heterotrophic micro-organisms with increasing exposure time to tributyltin, dibutyltin and triphenyltin.

Elutriate testing was useful in exposing the bacteria to water-soluble substances which provided a realistic estimation of bioavailability (Harkey et al. 1994). Unfortunately, the main limits of this kind of assay are: no exposure to whole sediment, poor extraction of nonpolar compounds such as PCBs and polyaromatic hydrocarbons, only toxicity of extractable and hydrosoluble compounds is measured (Ho and Quinn 1993; Harkey et al. 1994). Thereby, the Microtox[®] was carried out on organic extracts to provide information about the nonpolar compounds which are poorly available for pelagic organisms but can still exert adverse effects on benthic dwelling organisms. All tested sediment organic extracts were very toxic to *V. fischeri* and caused the death of all bacteria. This toxicity may be related to organic pollutants but also to the presence of high quantity of sulphur in the Bizerte lagoon. Indeed industrial sources in the area of Bizerte annually produce 434 t of SO_x (MAERH 2003). The high toxic effect of sulfur was also evidenced by Salizzato et al. (1998) using the Microtox[®]. The authors showed that sulfur was the most toxic component of the sediments comparing EC50 values of PAHs, PCBs and sulphur.

The sensitivity of Microtox[®] to low concentrations of sulphurs may contribute to mask a possible weaker effect of other components (Salizzato et al. 1998).

Responses obtained with the SOS Chromotest demonstrated that sediments from station S1 and at lesser extent S2, S3 and S4, contained pro-genotoxic organic compounds. Bacterial assays have been widely used to assess the genotoxicity of suspended or bottom sediments (reviewed in Chen and White 2004). The authors listed 14 published studies using the SOS Chromotest to assess the genotoxicity of sediments. The SOS responses obtained for the Bizerte lagoon ranged from 0.92 to 1.95 IF per gram of dw sediment. Those values were of

the same order of magnitude, albeit a bit lower as those reported for sediments of the Seine estuary (Cachot et al. 2006).

Sediment extract from S1 was shown to be the most genotoxic among all studied samples. This genotoxicity correlates with the organic chemical content of the sediment ($r=0.922$, $p=0.026$) as S1 had the highest total concentration for all organic contaminants (PAHs, PCBs and OCPs) (Table III.1). Thus, our field study revealed the genotoxic potency of pollutants accumulated in sediment from the S1 station located in the Bizerte canal at the vicinity of the Bizerte harbor. Our results are consistent with those reported by Cachot et al. (2006) and Dutka et al. (1996), who showed that POPs are inductors of SOS Chromotest.

The ability of the Microtox[®] test and SOS Chromotest to detect varying levels of sediment toxicity and genotoxicity was qualitatively evaluated with aqueous or organic extracts from five stations. Although the exposure conditions in both test is not the same, the results indicate that the SOS test can best discriminate among the genotoxic potentials of the five sediment samples. Indeed, the SOS induction factor at the station S1 was consistent with the organic and inorganic contamination levels measured, thus suggesting that genotoxicity in *E. coli* PQ37 resulted from contaminant exposure. In summary, this sensitive (Quillardet et al. 1982; Ohta et al. 1984) short-term bioassay system was sensitive enough to detect pro-genotoxicants accumulated in sediments from the Bizerte lagoon.

There was a global lack of correlation between toxicity/genotoxicity potency and the studied groups of pollutants in sediments. This could indicate that the toxic/genotoxic potency was probably more related to other pollutants/stressors than measured in our study. Also, no correlation was found between these bioassays ($r=0.792$). The differences in toxicity between these bioassays suggest that contaminants are affecting differently depending on the type of organism. This could be related with the routes of exposure of each organism to contaminants and highlights the importance of testing different matrix (i.e. solid phase and elutriates) for a reliable assessment of potential toxicity (Macken et al. 2008).

The medaka embryo-larval assay was also employed in this study to provide information on solid-phase associated contaminants. This bioassay simply consists in incubating freshly fertilised fish embryos for the whole duration of the embryonic phase in direct contact with the sediment collected from Bizerte lagoon. Lethal and sub-lethal effects are then monitored in exposed embryos and freshly hatched larvae. Native whole sediment testing using fish embryos represents a realistic scenario to simulate *in situ* exposure conditions (Kosmehl et al. 2008). Comparing to the control sediment, sediments of the Bizerte lagoon induced a significant reduction of embryo-larval viability and embryo cardiac activity, and promote

developmental abnormalities and postponed hatching. The highest observed embryo-larval mortality was 32% at S1 station, which might be enough to cause significant decline in the whole fish population (Hallare et al. 2005). At 20 dpf, the hatching rate was clearly reduced at S1 station compared to the control group and to the remaining stations. This reduction might be explained by the high levels of organic contaminants at S1, as confirmed by the significant negative correlations between hatching rate and the concentrations of Σ PAHs ($r=-0.967$), Σ PCBs ($r=-0.995$) and Σ OCPs ($r=-0.948$). Laboratory and field studies have also shown that PCB reduced the hatchability of eggs from brook trout (Freeman and Idler, 1975), rainbow trout (Harris et al. 1994), lake trout (Mac and Edsall, 1991) and Japanese medaka (Nirmala et al. 1999). On the other hand, such studies (Nirmala et al. 1999; Nakayama et al. 2005) showed that tributyltin (TBT) may reduce hatchability. Since the Bizerte lagoon contains high levels of TBT and its degradation products, monobutyltin (MBT) and dibutyltin (DBT) (Mzoughi et al. 2005), the hypothesis of reduced of hatching rate by these compounds is likely, but remains to be confirmed. Average time to hatch in control treatment group was 10.4 dpf with more than 80% of embryos hatching at 12 dpf. These results are globally consistent with the literature which report hatching as usually occurring between 9 and 12 dpf at 25–26 °C for the Japanese medaka (Gonzalez-Doncel et al. 2003; Farwell et al. 2006; Gonzalez-Doncel et al. 2008). Since buffer was changed every day, the small delay of hatching may be due to elimination of the chorionase enzyme responsible for the breakdown of the chorion and the releasing of embryos (Ojanguren et al. 1999). After exposure to sediments from the Bizerte lagoon, embryos exhibited significant delay of hatching (from 14.1 to 17.7%). This result may in part be due to lower oxygen levels in the sediment samples (mean of 77.2%) in comparison to the control (88.8%), since our data showed significant negative correlations between time to hatch and oxygen levels ($r=-0.988$, $p=0.001$). Oxygen levels appear to be a key parameter that initiates hatching in teleosts (Rombough 1988). Dave and Xiu (1991) suggested that the delay of hatching in zebrafish embryos can result from either inhibition of the hatching enzyme chorionase, osmotic disturbances interfering with the activity of the hatching enzyme, muscular action of the embryo, and increased oxygenation. There are many other physical variables known to alter embryo hatching time including temperature, light regime and intensity, and agitation (Marty et al. 1990; Gonzalez-Doncel et al. 2004; Yang and Yang 2004).

The average cardiac activity (10 days) in control embryos was 101 beats per minute. This data is quite inferior to that reported by Gonzalez-Doncel et al. (2005) who measured a cardiac rhythm stabilised at 180 beats per minute in 7 dpf-embryos but similar to the results

obtained by Barjhoux et al. (2012) in 7 dpf-control embryos. After exposure to S1 sediment, a moderate but not significant bradycardia was observed in exposed embryos. Interestingly, a similar result was observed in zebrafish embryos exposed to fluorene (Incardona et al. 2004) and medaka embryos exposed to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (Vicquelin et al. 2011).

Developmental abnormalities are currently used as sensitive endpoints in embryo-larval bioassays. In this study, many kinds of defects were recorded from the optimal development (as described by Iwamatsu 2004; Gonzalez-Doncel et al. 2005) and the baseline level of malformed larvae was 17%. Similar results were observed by Barjhoux et al. (2012) who measured a percentage of abnormal larvae of 16% in the control group. Such a percentage of larval abnormalities have already been reported in unexposed larvae for various fish species including medaka (Farwell et al. 2006; Benaduce et al. 2008). After exposure to sediments derived from five stations in the Bizerte lagoon, the following malformations were observed: oedema, axial skeletal deformities, cranio-facial deformities, cardio-vascular anomalies and eye anomalies. This spectrum of effects is characteristic of the Blue sac syndrome which has been largely described in fish embryos exposed to dioxin, PCB and PAHs compounds (Incardona et al. 2004; Wassenberg and Di Giulio 2004; Sundberg et al. 2005; Wassenberg et al. 2005; Carls et al. 2008; Vicquelin et al. 2011; Le Bihanic et al. 2014). Medaka embryo developmental abnormalities have been widely reported and associated with several industrial effluents, sewage and specific chemicals including organophosphate insecticides such as Diazinon (Hamm and Hinton 2000), 4-nonylphenol (Yokota et al. 2001), printing plants and sewage effluents (Zha and Wang 2006), and the antifouling agent such as triphenyltin and tributyltin (Zhang et al. 2008; Nakayama et al. 2005), among others.

The teratogenic potential of sediments could result of the accumulation of toxic compounds in the Bizerte lagoon. Data from chemical analysis showed that the concentrations of some heavy metal ions, such as As, Cu, Pb, and Zn, exceeded the ERL value which was used to assess the sediment quality of ocean and estuary in Canada and Florida (Long et al. 1995). Heavy metal such as Cd and Cu can be accumulated in medaka embryos after sediment-contact exposure (Barjhoux et al. 2012). The same authors showed that medaka embryos exposed to 12.70 and 23.11 $\mu\text{g g}^{-1}$ dw of copper developed morphological abnormalities, particularly spinal (kyphosis and lordosis) and cardiovascular deformities (abnormal positioning and heart looping). According to Li et al. (2009), zebrafish embryos exposed to 0.5 mM arsenite or above exhibited reduced survival, delayed hatching, retarded growth, and developmental abnormalities. In addition, among the low-molecular weight (LMW) PAHs detected in this study the concentrations of fluorene and acenaphthene in the

sediment exceeded ERL level. According to Incardona et al. (2004), zebrafish embryos exposed to 60 μM fluorene showed bradycardia and mid pericardial edema.

Comparing the toxicity observed with chemical analyzes (Table III.1), no clear gradient of contamination was found among the different stations in the Bizerte lagoon (except S1 station). That could be explained by the following reasons. Firstly, sediments in polluted environments can be contaminated with hundreds of different compounds, and these contaminants may exist in concentrations below detection limit of the analytical method but still be able to cause toxicological responses. Additionally, interactions between contaminants may result in antagonistic or synergistic effects that are difficult to predict only on the basis of individual toxicity of identified compounds. Secondly, bioavailability itself is a poorly understood phenomenon (Strmac et al. 2002) which is rather susceptible to many undefined variables (biological, physical, and chemical) and difficult to quantify.

Although data presented here in proved that the sediment contact assay with medaka embryos is suitable for measuring the toxicity of sediments, some disadvantages was detected. In fact, as the eggs were laid on the sediment surface, the accumulation in the embryos was restricted to the watersoluble chemicals that were released from the sediment into the overlying water and to accumulation from sediment particles in direct contact with the eggs. The available concentration of chemicals to fish eggs was therefore probably lower than that for benthic animals, which actively burrowed into the sediment.

The battery of parameters applied in this study included chemical (ΣMetals , ΣPAHs , ΣPCBs , ΣOCPs), physico-chemical (fine particles $<63\ \mu\text{m}$, TOC, NH_4) and biological endpoints (Microtox[®], SOS Chromotest, cumulative viabilities, hatching rate, cardiac activity, malformed larvae) provided a discrimination of sites after PCA analysis. The five stations studied exhibited different degree of toxicity, ranging from the cleanest station (S5) to the most polluted station (S1). The PCA analysis also confirmed that the sediments from S1 were the most toxic, due to high PAH, PCB, OCP and metals contamination, leading to generate a threat to benthic marine organisms, living this station.

The concept of integrative chemical and biological monitoring for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management is generally accepted. Chemical analyses of specific contaminants (e.g., PAHs, PCBs, OCPs, metals) provide insight in contaminant inputs, whereas biological monitoring gives insight about the toxicity of the environment and the health status of organisms. Considering our data, the relationship between the presence of specific contaminants (PAHs, PCBs, OCPs, metals), their potential toxicity and ability to affect marine organism is very complex. A point mentioned by several authors (e.g. Hill et al.

1994) which is implicit in the foregoing discussion is the necessity for using a battery of bioassays, covering several taxonomic groups, in any strategic monitoring programme. The present results show clearly that different taxa and endpoints will have varying susceptibilities to the multiplicity of contaminants present highly urbanized and in industrialised areas. Ideally, the test battery should include representatives of the major sediment-dwelling taxa, although general sensitivity to contaminants is also an important consideration.

III.5 Conclusions

The characterization of the surface sediment of Bizerte lagoon using a multi-battery and multi-phase approach was performed in this study. Although that the sediment organic extracts and aqueous sediment elutriates can provides information on the potential toxicity of bioavailable contaminants, the sediment contact fish embryo test (MELAc) provides an ecologically highly realistic and relevant exposure scenario. This assay is easy to perform, sensitive, cost effective, and ecologically relevant therefore it could be very useful in environmental monitoring program for sediment quality assessment. Altogether, our data suggest that sediments from the Bizerte lagoon are toxic, genotoxic and embryotoxic, and therefore, could be potentially hazardous for species living or feeding in the area.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research and the Aquitaine Region for their financial support.

Conclusion

Au final, nos données suggèrent que les sédiments de la lagune de Bizerte sont toxiques, génotoxiques et embryotoxiques, et par conséquent, pourraient être potentiellement dangereux pour les espèces aquatiques qui vivent ou se nourrissent au contact de ce compartiment.

Les résultats obtenus démontrent aussi qu'il n'y a pas toujours de corrélation entre les tests biologiques utilisés. Ceci peut être dû à la différence de sensibilité des tests biologiques utilisés et aux différentes phases sédimentaires testées (phase aqueuse, extrait organique et sédiment entier). En plus, la toxicité mesurée n'est pas la simple résultante de l'effet d'un contaminant précis mais plutôt de mélanges complexes où la nature et la quantité des contaminants, ainsi que les caractéristiques intrinsèques de la matrice sédimentaire, interviennent. Ces résultats supportent l'utilisation d'une batterie de bioessais dans l'évaluation de la qualité des sédiments.

L'utilisation de bioessais permet d'évaluer la toxicité de la fraction biodisponible des polluants sédimentaires, mais non de démontrer l'impact sur les organismes aquatiques résidant dans la lagune. Pour ceci, il est nécessaire de déterminer la bioaccumulation des polluants et les effets induits chez quelques espèces représentatives de cette lagune. Nous allons donc aborder dans le chapitre suivant les résultats relatifs à la biosurveillance de lagune de Bizerte en utilisant deux espèces sentinelles, le gobie *Zosterisessor ophiocephalus* et la moule *Mytilus galloprovincialis*.



CHAPITRE IV

BIOSURVEILLANCE DE LA LAGUNE DE BIZERTE PAR DEUX ESPÈCES SENTINELLE: MOULE (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*) ET POISSONS (*ZOSTERISESSOR OPHIOCEPHALUS*)

Introduction

Le concept de surveillance biologique (ou “*biomonitoring*”, selon le terme anglo-saxon consacré), qui repose sur l'étude des réponses biologiques des organismes aux polluants, est aujourd'hui en plein essor. Les effets biologiques des polluants peuvent en effet être assimilés à des indicateurs biologiques de pollution et d'état de santé de l'organisme. La caractérisation de ces biomarqueurs peut permettre la mise en évidence précoce de la manifestation biologique de contaminations chimiques du milieu naturel avant l'altération de la structure des organismes, et surtout avant que toute la population ou l'écosystème soient perturbés. Dans les études de surveillance biologique, l'accent est aujourd'hui mis sur le couplage chimie/biologie car l'interdépendance de ces deux disciplines est une composante majeure de la surveillance des effets des polluants. Il convient de privilégier les approches multimarqueurs, en vue de fournir un indice global de qualité du milieu et, en dépit du manque de spécificité de chaque biomarqueur considéré individuellement, de révéler les principales classes de polluants impliquées. C'est dans ce but, que nous avons suivi dans cette étude de biosurveillance de la lagune de Bizerte un ensemble de biomarqueurs (les activités enzymatiques AChE, GST, EROD et catalase et les teneurs en TBARS). Cette étude présente l'avantage de donner une vision réelle et globale de la qualité des sites étudiés ainsi que la possibilité d'établir des relations de cause à effet entre la présence des contaminants et les réponses biologiques.

Dans ce travail, les POPs (HAP, PCB, OCP, et PBDE) ont été déterminés dans les tissus mous des moules *Mytilus galloprovincialis* et les muscles des poissons gobie *Zosterisessor ophiocephalus*. Ces POPs ont été choisis d'une part à cause de leur toxicité pour la plupart des organismes marins et leur capacité de bioaccumulation, d'autre part en raison de l'abondance de ces polluants toxiques dans les rejets industriels et urbains. L'accumulation des POPs au niveau des tissus ont été déterminés par l'étude de différents biomarqueurs. Cette relation de cause à effet a été déterminée antérieurement chez les organismes marins collectés sur d'autres sites de prélèvement, mais en utilisant des paramètres abiotiques (pH, salinité, température..) et les teneurs en contaminants présents dans les sites étudiés. En revanche aucune étude n'a montré la répartition spatiale des POPs et leurs effets à travers l'utilisation d'un ou plusieurs organismes bioindicateur.

Parallèlement à l'étude des biomarqueurs nous avons mesuré des indices physiologiques reflétant l'état général des animaux (facteur de condition et indice hépato-somatique) ainsi que des paramètres abiotiques (température de l'eau, pH, salinité). Le processus de bioaccumulation est en effet influencé par les propriétés physico-chimiques des composés

mais aussi par les facteurs biologiques et écologiques spécifiques des espèces exposées, tels que l'habitat, le sexe, la reproduction ou encore l'état de santé des animaux (Connolly et Glaser, 2002; Bodin et al., 2007).

L'objectif de ce chapitre (présenté sous la forme de deux articles) est donc double. Premièrement, effectuer un état des lieux de la contamination de moule et poisson par les POPs. Deuxièmement, déterminer un ensemble de biomarqueurs et comprendre les relations existantes entre les facteurs biotiques, abiotiques et la bioaccumulation.

IV.1 Article 4: Assessment of pollution in the Bizerte lagoon (Tunisia) by the combined use of chemical and biochemical markers in mussels, *Mytilus galloprovincialis*

Badreddine Barhoumi ^{ab}, Karyn LeMenach ^b, Christelle Clérandeau ^b, Walid Ben Ameer ^a,
Hélène Budzinski ^b, Mohamed Ridha Driss ^a, Jérôme Cachot ^{b,*}

^a University of Carthage, Faculty of Sciences of Bizerte, Laboratory of Environmental Analytical Chemistry (05/UR/12-03), 7021 Zarzouna, Bizerte, Tunisia

^b University of Bordeaux, CNRS, UMR EPOC 5805, avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France

Marine Pollution Bulletin, 2014.

Abstract

In this study, a new integrated approach was used for the first time to assess the environmental quality of the Bizerte lagoon in northern Tunisia, making use of biomarkers and contaminant levels in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Persistent organic pollutants (PAHs, PCBs, DDTs, HCB and PBDEs) were quantified in mussel tissue from five selected sites. In addition to this, antioxidant enzyme activities such as acetylcholinesterase (AChE), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) were measured in gills, and environmental parameters were measured in water samples collected at each site. Results showed that despite the levels of measured organic contaminants in these five spots in the Bizerte lagoon not being particularly high compared with other contaminated/polluted sites worldwide, the selected battery of biomarkers responded significantly to the environmental changes. This allowed different levels of pollution to be identified for different sites. GST and AChE activities were correlated with the amount of DDTs bioaccumulated in mussel tissue. These two enzymatic activities were also correlated to temperature and pH, suggesting the influence of these environmental parameters on antioxidant responses in gill tissue. Furthermore, although temperatures and pH recorded in this study could not be regarded as a source of stress, they seemed to add a synergistic effect to that produced by DDTs to induce or inhibit antioxidant enzymes. No significant differences

were observed in CAT activity. Principal component analysis (PCA) showed a clear separation of the sampling sites in three different assemblages, which are consistent with the POP levels found in mussel tissue. Our results confirmed the usefulness of combining biological marker measurements and chemical analysis when examining mussel specimens to assess chemical pollution in the Bizerte lagoon.

Keywords: Pollution; Persistent organic pollutants; bioaccumulation; biomarkers; Antioxidant enzymes; *Mytilus galloprovincialis*; Bizerte lagoon

IV.1.1 Introduction

Marine ecosystems are of high ecological and economic importance, because they support vital habitats for organisms and sustain several anthropogenic pressures. Highly productive areas such as estuaries and coastal lagoons are among the most extensively modified and threatened ecosystems, mainly due to urban development, industrialization, and tourism (Clark, 2001; Walker et al., 2001). As a result, complex mixtures of contaminants are continuously released in these ecosystems, reducing water quality and imposing severe restrictions on organisms. This can ultimately lead to a decrease in natural resources (Cajaraville et al., 2000; Monserrat et al., 2007; Cravo et al., 2009). One example of such an area is the Bizerte lagoon, a major coastal lagoon on the north coast of Tunisia. It is particularly important for fisheries, especially bivalves. The lagoon, located close to areas of heavy industrial and agricultural activities, has been also been used in shellfish production since 1964 (Beji, 2000). The area is also polluted with a great deal of industrial waste, pesticides and chemical fertilizers, through soil erosion and runoff leading. This has led to a decrease in bivalves and fish production over the last few decades (ANPE, 1990). To put this into perspective, only 61.06 tons of mussels were produced in 2002 (CRDA, 2002) compared with 116.50 tons in 1998 (CRDA, 1998). This sharp drop is one of the main reasons that the Tunisian authorities have begun to focus on maintaining the chemical and biological quality of mussels in the area.

Biomonitoring based on the quantification of contaminant concentrations in bioindicator organisms has been widely used in environmental surveys over the past few decades. Mussel watch-like programs have been developed successfully in many countries (Goldberg, 1975). Bivalves, and especially mussels (*Mytilus galloprovincialis*), have been widely used as indicators of the marine and estuarine pollution. Such molluscs are sessile filter feeders, able

to accumulate and tolerate high concentrations of pollutants, present across a very wide geographical area, easy to collect, and particularly abundant in coastal and estuarine waters (Goldberg, 1986).

In addition to chemical analyses, the use of different biomarkers has been introduced in monitoring programs to evaluate not only contaminant concentrations in sediments, water column and organisms but also the effects of pollutants on the organisms (Bayne, 1989).

Contaminants usually appear in the environment as complex mixtures that can cause interactive effects on the biota that are impossible to evaluate through chemical analyses alone. In this sense, biomarkers offer an integrated assessment of exposure levels and effects of pollutants in wildlife. There are several biomarkers that are more specific for certain types of xenobiotics and, thus, the use of a battery of biomarkers together with chemical analyses has been strongly recommended to be included in monitoring programs (OSPAR, 2000; ICES, 2008). Three biomarkers were selected in this study. Acetylcholinesterase (AChE) activity is an indicator of synaptic neurotoxic effects (Day and Scott, 1990; Bocquené and Galgani, 1998); glutathione S-transferase (GST) is a phase II enzyme involved in the detoxification of organic xenobiotics (Habig et al., 1974; Lee et al., 1988); and catalase (CAT) involved in oxidative stress response caused by excessive oxyradical formation in the metabolism of various compounds (Claiborne, 1985; Di Giulio et al., 1989).

The first objective of our study was to determine concentrations of persistent organic pollutants, POPs (PAHs, PCBs, Pesticides and PBDEs) in *Mytilus galloprovincialis* specimens. Mussel samples were collected from five sites around the Bizerte lagoon, each effected by POPs (Trabelsi and Driss, 2005; Barhoumi et al., 2013a) and heavy metals (Ben Garali et al., 2010) to different degrees. In this human impacted aquatic area, several previous studies have investigated the application of biochemical tools for pollution biomonitoring (Dellali et al., 2001b, 2004; Khessiba et al., 2001, 2005; Roméo et al., 2006; Mahmoud et al., 2010). However, no studies have assessed the levels of POPs in Bivalves from the Bizerte lagoon.

The second purpose was to evaluate selected biomarkers in mussels, in order to (i) investigate biological responses of organisms from sites with different history of pollution and (ii) tentatively correlate pollutant body burden and induced effects in mussels. In addition, environmental (temperature, pH and salinity) and biological (CI) factors were quantified in water samples and mussels from each site, in order to investigate the possible effects of these variables on pollutants concentration and biomarker responses.

IV.1.2 Materials and methods

IV.1.2.1 Site description

Five mussel (*M. galloprovincialis*) sampling stations were chosen within the area of the Bizerte lagoon used for our study (Figure IV.1.1). They were selected based on possible differences in contamination levels and availability of bivalves: two non-urbanized areas considered to be relatively uncontaminated (S2 and S5), and three zones clearly exposed to anthropogenic pressure (S1, S3 and S4).

S1 (37°15.48'N, 9°51.18'E), is located in the Bizerte channel near the cement plant, and is influenced by intense fishing, passage of ships, and urban effluents from the city of Bizerte.

S2 (37°13.48'N, 9°48.26'E), is an exchange point between the lagoon of Bizerte and the Mediterranean Coast. It is subjected to complex hydrodynamic conditions, with relatively low levels of contamination (Khessiba et al., 2001; Barhoumi et al., 2013a).

S3 (37°12.49'N, 9°47.90'E), is located close to the mouth of Haima River in the northwestern part of the lagoon, in a region of intensive agricultural activity, including extensive use of pesticides. This station is also influenced by the passage of commercial cargo vessels between the cities of Bizerte and Menzel Bourguiba.

S4 (37°13.33'N, 9°51.50'E), is located near a town of 10,000 inhabitants, surrounded by industrial units (Textile fabrics, electronic industries and metallurgy). The sampling site receives a constant influx of untreated waste water.

S5 (37°8.38'N, 9°52.35'E), is located far from urban and industrial sources of pollution, but remains influenced by agricultural inputs.

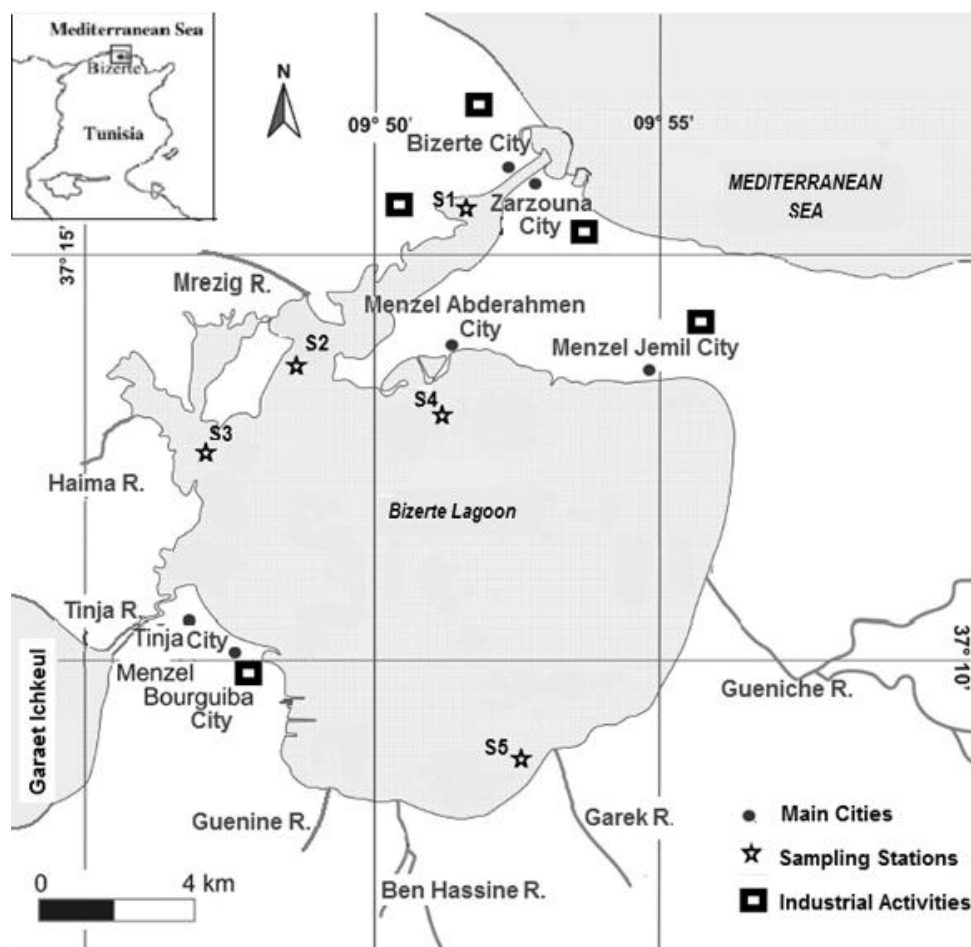


Figure IV.1.1 The Bizerte lagoon and the five selected sampling stations.

IV.1.2.2 Sample collection and preparation

Approximately 80 specimens of similarly-sized (4.4–5.2 cm shell length) wild Mediterranean mussels were collected from each sampling site in February 2012. This work was carried out by a scuba diver, operating at a depth of around three to five metres. The specimens were then immediately taken to the laboratory in ice boxes.

Mussels were sacrificed three hours after collection to ensure uniform sampling and transport conditions across all sites. To assess the general health of mussels, 10 animals were used at each station for the condition index measurement (CI) (the ratio between whole soft tissues weight and shell weight). To determine contaminants (OCs, PAHs and PBDE), whole body tissues of 60 specimens from each station were dissected, pooled in 3 samples (each with tissues of 20 specimens), and stored at -20°C , before being freeze-dried and homogenized with a blender. For biochemical parameters, 10 organisms were dissected, and the individual gills were immediately stored at -80°C until required for biomarker analysis.

Physic-chemical parameters (temperature, salinity and pH) were measured *in situ* at all sampling sites using a WTW-197i multimeter.

IV.1.2.3 Lipid content

Lipid content was determined using microwave assisted extraction (MAE) (Bodin et al., 2009). A few milligrams of freeze-dried tissue were weighed and then extracted with dichloromethane (20 mL, 30 W, 10 min). Organic extract was then filtered and evaporated to dryness using a RapidVap evaporator (Labconco, Kansas City, MO, USA). The residue was weighed to gravimetrically estimate the lipid content of the samples. The lipid content was expressed in percentage of dry-basis lipid content (LC%) as follows:

$$LC\% = (m_1/m_{dm}) * 100$$

where m_1 is the mass of extracted lipid (g), m_{dm} is the mass of dry matter (g).

IV.1.2.4 Chemicals

All reagents used for biomarker analyses (bovine serum albumin (BSA); hydrogen peroxide (H_2O_2); acetylthiocholine (AcTCh); dithiobis-nitrobenzoate (DTNB); 1-chloro,2,4, dinitrobenzene (CDNB) and 5,5', reduced glutathione (GSH) were purchased from Sigma (France).

The pesticide grade dichloromethane was purchased from Acros Organics (Noisy le Grand, France). Pentane was obtained from Atlantic Labo (Bruges, France), sulphuric acid Sharlau (95–98% extra pure) and iso-octane Sharlau were purchased from ICS (Gradignan, France). The copper (40 mesh, 99.5% purity, Aldrich, Strasbourg) was activated with hydrochloric acid (1 N) and then washed with water, acetone, and CH_2Cl_2 . The alumina (150 basic, type T particle size 0.063–0.2 mm) and the silica (Silica gel, particle size 0.063–0.2 mm) (Merck, Darmstadt, Germany) were washed with CH_2Cl_2 and activated for 14 h at 150°C. The acid silica gel was prepared by mixing 600 g of silica gel and 400 g of sulphuric acid over night at 200 °C (Müller et al., 2001).

Standard reference material SRM 2262 (chlorinated biphenyl congeners in isooctane) and SRM 2261 (pesticides in isooctane) was provided by the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Individual solutions of PBDEs (BDE 47, BDE 99, BDE 119, BDE 153) were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (CIL USA, purity 99%). CB 30, CB 103, CB 155 and CB 198 were delivered as neat crystals by Promochem (Molsheim, France, Purity 99%). Octachloronaphthalene (OCN) was used as syringe standard and purchased from Ultra Scientific (North Kingstown, USA, Purity 95%).

The PAHs studied range from diaromatics (Naphthalene) to hexa-aromatics (Benzo[ghi]perylene). The Standard Reference Material, SRM 2260, aromatic hydrocarbons in toluene (Nominal Concentration 60 mg mL⁻¹), a standard compound solution of 24 aromatic hydrocarbons was provided by the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). The compounds used as internal standards for the quantification of PAHs were 9 perdeuterated PAHs. Naphthalene-d₈, dibenzothiophene-d₈, phenanthrene-d₁₀, anthracene-d₁₀, benzo[e]pyrene-d₁₂, benzo[a]pyrene-d₁₂ and benzo[ghi]perylene-d₁₂ were from Cambridge Isotope Laboratories (CIL, Andover, MD, USA), fluoranthene-d₁₀ and chrysene-d₁₂ from MSD isotopes (Division of Merck Frost Canada INC, Montreal, CND). Benzo(b)fluoranthene-d₁₂ and pyrene-d₁₀ were used as syringe standard and purchased from MSD isotopes (Division of Merck Frost Canada INC, Montreal, CND).

IV.1.2.5 Chemical analyses

IV.1.2.5.1 Extraction and clean-up

Mussel samples were freeze-dried and homogenized with a blender. The combined extraction protocol for OCs, PBDEs and PAHs was adapted from Thompson et al. (2002), Tapie et al. (2008), Baumard et al. (1997) and Budzinski et al. (2000). The appropriate volume of the internal standard solutions (PCB congeners 30, 103, 155 and 198 for PCBs, OCPs and PBDEs, perdeuterated PAHs for PAHs) were gravimetrically added to about 0.5 g of lyophilized mussel tissues. Organic pollutants were extracted by accelerated solvent extraction on a ASE 200 system (Dionex, Voisins le Bretonneux, France) with dichloromethane. The parameters used during the extraction procedure were as follows: temperature (100 °C), static time (8 min), pressure (130 bars), heating time (5 min), flush volume (60%), and purge time (60 s). After extraction, the extract was concentrated using a RapidVap evaporator (Labconco, Kansas City, MO, USA) near 1 mL and first purified on alumina micro-column. The compounds were eluted with 3x5 mL dichloromethane. The extract was reconcentrated under a gentle flow of nitrogen, the solvent exchanged with isooctane and evaporated again under nitrogen flow up to 1 mL. The extract was further purified on silica gel micro-column, previously conditioned with n-pentane. The alkane fraction was discarded by rinsing the column with n-pentane and the compounds were eluted with 3x5 mL n-pentane/dichloromethane (65/35; v/v). The extract was concentrated under nitrogen flow and transferred into GC vials containing a 300 µL glass insert. The deuterated PAH internal standard solution (pyrene-d₁₀ and benzofluoranthene-d₁₂) was gravimetrically added to the final extract. The latter extract was divided into two fractions, the first one being

used for the analysis of PAHs by Gas Chromatography-mass spectrometry (GC/MS), and the second purified on an acid silica gel column containing a bed of activated copper. OCs and PBDEs were eluted with 3x5 mL n-pentane/dichloromethane (90/10; v/v). The extract was then concentrated, transferred to isooctane and the syringe standard (Octachloronaphthalene) was added before analysis by Gas Chromatography coupled to Electron Capture Detector (GC/ECD).

IV.1.2.5.2 Quantification of OCs and PBDEs

Separation and detection of OCs and PBDEs was performed by high-resolution gas chromatography (GC; Agilent 6890 Series gas chromatography system; Agilent Technologies, Philadelphia, PA, USA) equipped with a ^{63}Ni electron capture detector, and both PTE-5 (30 m \times 0.32 mm i.d., 0.32- μm film thickness) and HP1 (30 m \times 0.32 mm i.d., 0.25- μm film thickness) capillary columns were used. The operating conditions were as follows: injector temperature, 270 °C, detector temperature, 300 °C. The GC temperature program was 70 °C (1 min hold) to 140 °C at a rate of 25 °C min $^{-1}$, 179 °C at 2 °C min $^{-1}$, 210 °C at 1 °C min $^{-1}$ and then to 300 °C (10 min hold) at 5 °C min $^{-1}$. The carrier gas was hydrogen (H_2), set at a flow rate of 1.5 mL min $^{-1}$. The detector make-up gas was nitrogen, set at a flow rate of 60 mL min $^{-1}$. Sample injection volume: 1 μL . Injection mode: splitless (1 min). The data presented in this paper were obtained using the PTE-5 column, and a HP1 capillary column was used as second column to confirm the identification of OCs and PBDEs compounds in mussels.

PCBs (SRM 2262), OCPs (SRM 2261) and PBDEs (BDE47, 99, 119 and 153) were quantified in relation to internal standards (CB 30, CB 103, CB 155, CB 198). The relative response factors of the different compounds were determined by injecting standard solutions (SRM 2262, SRM 2261 and a standard solution prepared from pure crystals for PBDEs) spiked with the same solution of internal standards as that used for spiking the samples. Sample concentrations are expressed as nanograms per gram dry weight (ng g $^{-1}$ dw).

IV.1.2.5.3 Quantification of PAHs

The aromatic fraction was analysed by gas chromatography–mass spectrometry in SIM mode (GC–MS; HP 5890 Series II, MSD 5972, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) using an HP5-MS capillary column (5% diphenylsiloxane–95% dimethylsiloxane; 30m \times 0.25 mm \times 0.25 μm ; Agilent). The injector temperature was maintained at 280 °C. The GC temperature program was from 50 °C (2 min) to 300 °C (8 min) at 10 °C min $^{-1}$. The carrier gas was helium at a constant flow rate of 1 mL min $^{-1}$. The GC was coupled to a HP 5972 mass

selective detector (MSD) (electronic impact: 70 eV, voltage: 2000 V) operating in single ion monitoring mode (SIM) using the molecular ion of each compound at 1.23 scan/s. The interface temperature was 290 °C.

The PAHs were quantified relative to perdeuterated PAHs added to the samples prior to the extraction. The response factors of the different compounds were measured by injecting SRM 2260 solution spiked with the same solution containing the perdeuterated PAHs as the one used for spiking the mussels. The PAHs studied ranged from di-aromatic (Naphthalene) to hexa-aromatic (benzo[ghi]perylene) and included: Naphthalene (Nap); Acenaphthylene (Acy); Acenaphthene (Ace); Fluorene (Fl); Dibenzothiophene (DBT); Phenanthrene (Phe); Anthracene (Ant); Fluoranthene (Flu); Pyrene (Pyr); 2,1 Benzonaphthothiophene (2,1BNT); Benz[a]anthracene (BaA); Chrysene (Chry); Triphenylene (Triph); Chry plus Triph (Ch); Benzo[b]fluoranthene (BbF); Benzo[j]fluoranthene (BjF); Benzo[k]fluoranthene (BkF); BbF plus BjF plus BkF (BF); Benzo[e]pyrene (BeP); Benzo[a]pyrene (BaP); Perylene (Per); Dibenz[a,h]anthracene (DahA); Dibenz[a,c]anthracene (DacA); DahA plus DacA (DA); Indeno[1,2,3-cd]pyrene (IP); benzo[ghi]perylene (BP). PAH concentrations are given in ng g^{-1} dw.

IV.1.2.5.4 Quality control and quality assurance

To ensure quality assurance, procedural blanks were regularly performed during the extraction process. No pesticides, PCBs, or PBDEs were found in the blanks. Naphthalene, the most volatile PAH, was detected, albeit at low concentration, in the blanks. Because of this, samples were corrected for blanks only for that particular compound. Samples and blanks were spiked with internal recovery standards (CB 30, CB 103, CB 155 and CB 198 for OCs and PBDEs, 9 perdeuterated PAHs for PAHs) prior to extraction procedures and by syringe standard (OCN for OCs and PBDEs, Benzo(b)fluoranthene-d12 and pyrene-d10 for PAHs) before injection to monitor methodological analyte losses. Recoveries over 80% were accepted. Blank injections of isooctane were performed between each sample injection to ensure the cleanliness of the GC/ECD and GC/MS injector. Limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were calculated by the signal-to noise ratio (3 : 1 and 10 : 1, respectively) for each chemical class and were respectively 0.10 and 0.40 ng g^{-1} dw for DDTs, 0.12 and 0.22 ng g^{-1} dw for HCB, 0.02 and 0.10 ng g^{-1} dw for PCBs, 0.10 and 0.30 ng g^{-1} dw for BDE 47 and 0.10 and 0.25 ng g^{-1} dw for PAHs.

IV.1.2.6 Biochemical analyses

IV.1.2.6.1 Preparation of tissue extracts

Gill samples were removed from -80 °C, thawed on ice and homogenized with an Ultra-Turrax® tissue homogenizer in 1:3 (v:v) 100 mM Tris–HCl buffer containing 0.1% Triton X-100, pH 7. Homogenates were centrifuged at 10,000 g for 20 min. All preparation procedures were carried out at 4 °C. After centrifugation, the supernatant (fraction S9) was retained; divided into several aliquots and kept at -80 °C for subsequent analyses of biomarkers (AChE, CAT and GST). All assays were performed in triplicate.

IV.1.2.6.2 Protein

The protein concentration in the S9 fraction was measured using Bradford's (1976) colorimetric method with bovine serum albumin (BSA) as a standard. All protein measurements were carried out using a spectrophotometer microplate reader (Synergy HT, BioTek), and expressed in mg mL⁻¹.

IV.1.2.6.3 AChE

Measurements of AChE activity were performed using the colorimetric method of Ellman et al. (1961). Absorbance at 412 nm was recorded for samples and blanks by using a microplate-reading UV-spectrophotometer (Synergy HT, BioTek). AChE activity was expressed in nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein using a molar extinction coefficient of 13.6 mM⁻¹ cm⁻¹.

IV.1.2.6.4 CAT

CAT activity was measured on a UVIKON 933 spectrophotometer (BioTek) by the decrease in absorbance at 240 nm due to H₂O₂ consumption (extinction coefficient, $\epsilon = 0.04$ mM⁻¹ cm⁻¹), in a reaction solution containing 100 mM phosphate buffer, pH 7.4 and 30 mM H₂O₂ (Claiborne, 1985). Catalase activity was calculated as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumed min⁻¹ mg⁻¹ of proteins.

IV.1.2.6.5 GST

The GST assay was performed using a modified version of the method developed by Habig et al. (1974). GST activity towards 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was measured spectrophotometrically (UVIKON 933 spectrophotometer, BioTek) in a reaction mixture containing 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 20 mM CDNB and 20 mM GSH. The activity rate of GST was measured as the change in OD/min at 340 nm (extinction coefficient, $\epsilon = 9.6$ mM⁻¹ cm⁻¹), and expressed as $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein.

IV.1.2.7 Statistical analysis

The results of chemical (PAH, PCB, DDT and PBDE), biological (CI and LC) and biochemical (GST, CAT and AChE enzymatic activities) parameters were reported as mean \pm S.D. To identify differences of chemical and biochemical parameters between sites (level of significance at $p < 0.05$), results were initially tested for normality (Shapiro–Wilk’s test on residues with 1% risk) and equality of variance (Levene’s test, 5% risk). Afterwards, significant differences between treatments were tested with one way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc Tukey’s test ($p < 0.05$). If conditions for ANOVA were not fulfilled, non-parametric Kruskal–Wallis’s test and Bonferroni–Dunn’s post-hoc test were used ($p < 0.05$). The existence and strength of relationships between parameters were determined by parametric Pearson’s bivariate correlation analysis. Principal component analysis (PCA) was performed to discriminate the different sites using the mean values of the entire dataset (Chemical, biological, biochemical and abiotic parameters). Statistical analyses of data were performed using the software STATISTICA 7.1 from StatSoft (Maison Alfort, France).

IV.1.3 Results

IV.1.3.1 Environmental factors

Physicochemical minimum and maximum parameters of water samples including temperature, salinity, and pH levels varied little across sites changing between 12.0–16.5 °C, 33–35.2 psu and 7.1–7.8, respectively (data not shown).

IV.1.3.2 Body condition of mussels

No significant differences between stations were observed in the condition index of the mussels with the exception of stations S1 and S2 ($p < 0.05$). The lowest value, indicating poor physiological condition, was measured at station S1. The highest CI value was measured at station S2 (Table IV.1.1).

The lipid content of the sampled mussels varied from 13.7 % at S3 to 20.9 % at S2 but no significant variation was observed between sites (Table IV.1.1). No significant correlation was found between OCPs, PCBs, PAHs or PBDE concentrations and total lipid content ($p > 0.05$).

Table IV.1.1 Mussels characteristics and concentrations of organo-halogenated compounds (ng g⁻¹ dw, mean ± SD), in their soft tissue.

Site	S1	S2	S3	S4	S5
CI	1.2 ± 0.3 (b)	1.6 ± 0.3 (a)	1.4 ± 0.2 (ab)	1.3 ± 0.3 (ab)	1.5 ± 0.3 (ab)
LC(%)	14.1 ± 1.6 (a)	20.9 ± 1.2 (a)	13.7 ± 7.5 (a)	16.4 ± 0.3 (a)	14.0 ± 3.0 (a)
Pesticides					
HCB	0.5 ± 0.1 (b)	0.7 ± 0.2 (b)	0.6 ± 0.1 (b)	0.1 ± 0.1 (a)	0.9 ± 0 (b)
Lindane	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
cis chlordanes	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
trans chlordanes	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
Mirex	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
2,4'DDE	2.0 ± 0.8	1.4 ± 1.2	1.5 ± 1.3	1.2 ± 0.8	0.7 ± 0
2,4'DDD	nq	nq	nq	nq	nq
2,4'DDT	8.3 ± 0.9	3.3 ± 0.4	7.1 ± 4.3	5.1 ± 0.8	5.6 ± 4.1
4,4'DDE	6.7 ± 1.0	5.2 ± 1.7	10.9 ± 2.9	4.5 ± 0.2	5.5 ± 1.1
4,4'DDD	9.3 ± 3.9	3.3 ± 0.3	9.5 ± 2.3	12.3 ± 2.6	8.3 ± 4.0
4,4'DDT	2.0 ± 0.4	<lod	3.4 ± 0.9	<lod	<lod
ΣDDTs	28.3 ± 5.7 (a)	13.1 ± 2.3 (a)	32.3 ± 11.3 (a)	23.1 ± 1.7 (a)	20.1 ± 9.0 (a)
ΣOCPs	28.8 ± 5.8	13.8 ± 2.4	33.0 ± 11.2	23.2 ± 1.7	21.0 ± 9.0
PCBs					
CB 28	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
CB 52	5.1 ± 1.2	5.3 ± 0.6	7.4 ± 6.3	0.7 ± 0.6	1.3 ± 1.2
CB 101	10.8 ± 7.1	6.5 ± 2.3	12.9 ± 3.6	8.0 ± 1.3	10.7 ± 1.6
CB 118	4.5 ± 0.5	<lod	5.3 ± 3.2	2.3 ± 0.2	2.0 ± 0.8
CB 138	18.1 ± 11.1	11.7 ± 4.3	25.7 ± 2.4	17.8 ± 1.5	14.7 ± 1.8
CB 153	32.9 ± 20.4	32.0 ± 4.5	53.8 ± 1.0	35.3 ± 1.8	34.3 ± 2.0
CB 180	5.7 ± 4.5	3.8 ± 0.7	9.1 ± 1.2	7.4 ± 6.2	4.8 ± 0.6
CB 1	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
CB 8	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
CB 18	4.5 ± 0.5	3.8 ± 1.1	4.5 ± 0.7	2.3 ± 0.6	2.0 ± 0.2
CB 29	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
CB 44	1.8 ± 0.6	2.4 ± 0.8	2.7 ± 0.4	1.3 ± 0.2	2.0 ± 0.9
CB 50	3.4 ± 1.2	3.5 ± 0.5	4.8 ± 0.3	2.2 ± 2.2	4.3 ± 1.7
CB 66	5.6 ± 3.2	4.9 ± 0.7	7.0 ± 2.4	5.4 ± 0.9	4.1 ± 0.5
CB 77+154	nq	nq	nq	nq	nq
CB 87	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
CB 104	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
CB 105	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
CB 126	10.6 ± 3.7	9.6 ± 1.9	9.8 ± 0.8	7.8 ± 0.8	6.6 ± 1.7
CB 128+187	2.5 ± 1.2	<lod	4.5 ± 0.7	2.2 ± 0.7	2.0 ± 0.8
CB 170	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
CB 188	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
CB 195	1.4 ± 0.5	0.4 ± 0.2	2.3 ± 0.1	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.1
CB 201	1.4 ± 0.6	5.1 ± 0.4	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.2	<lod
CB 206	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
CB 209	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
ΣPCBs	108.4 ± 52.7 (a)	89.1 ± 14.3 (a)	150.6 ± 3.6 (a)	94.6 ± 5.8 (a)	89.7 ± 3.5 (a)
PBDEs					
BDE 47	1.7 ± 0.4	0.8 ± 0.1	4.9 ± 0.1	3.4 ± 0.4	3.0 ± 0.3
BDE 99	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
BDE 119	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
BDE 153	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod

nq: Not quantifiable.

<lod: below the limit of detection.

Values in the same row marked with different letters indicate significant differences at p < 0.05.

IV.1.3.3 Chemical analyses

IV.1.3.3.1 Organochlorinated compounds (OCs)

In Table IV.1.1 were reported levels (mean \pm standard deviation nanograms per gram dry weight) of the organochlorinated compounds (Σ PCBs, Σ DDTs and HCB) measured in mussel tissues from all stations.

PCB contamination was homogeneous within the lagoon, since no concentration differences were found between the five sampling sites ($p > 0.05$). More specifically, station S3 ($150.6 \pm 3.6 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$), located close to the mouth of Haima River, was the most contaminated site, showing values twice those of S2 ($89.1 \pm 14.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$). Overall, CB 153 was the most abundant congener accumulated in bivalve soft tissues, accounting for 36 % of the Σ PCBs, followed by CB 138 (17 %) and CB 126 (9 %) (Figure IV.1.2A). Grouping PCB congeners according to their grade of chlorination, the hexa-CBs were the most representative of the contamination pattern (53 %), followed by penta-CBs (20.7 %), tetra-CBs (14.4 %) and hepta-CBs (5.9 %), while octa-(2.8 %) and trichlorobiphenyls (3.3 %) made up a small percentage of the Σ PCBs (Figure IV.1.2B).

For all DDTs (Σ DDTs), the spatial pattern was similar to that exhibited by PCBs (Table IV.1.1). The highest concentrations of residues were observed in S3 ($32.3 \pm 11.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) and S1 ($28.3 \pm 5.7 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$), while the lowest in S2 ($13.1 \pm 2.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$). No significant differences were found among sampling sites ($p > 0.05$). The 4,4'-homologues were the most representative of the contamination pattern for each sampling site: 4,4'-DDD was the most abundant compound, accounting on average for the 36 % of the Σ DDTs, followed by the 4,4'-DDE (29 %) and 4,4'-DDT (4 %) (Figure IV.1.2C). In contrast, 2,4'-homologues were less abundant than 4,4' ones, with the exception of 2,4'-DDT, whose levels were higher than those of the parental compound 4,4'-DDT in each station.

HCB concentrations in mussels were absolutely negligible, with average values of $0.56 \pm 0.25 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ (range $0.12 \pm 0.08 - 0.87 \pm 0.03 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) (Table IV.1.1). However significant differences were observed between S4 and the remaining stations ($p < 0.05$). Lindane, cis chlordane, trans chlordane and Mirex were below the limit of detection.

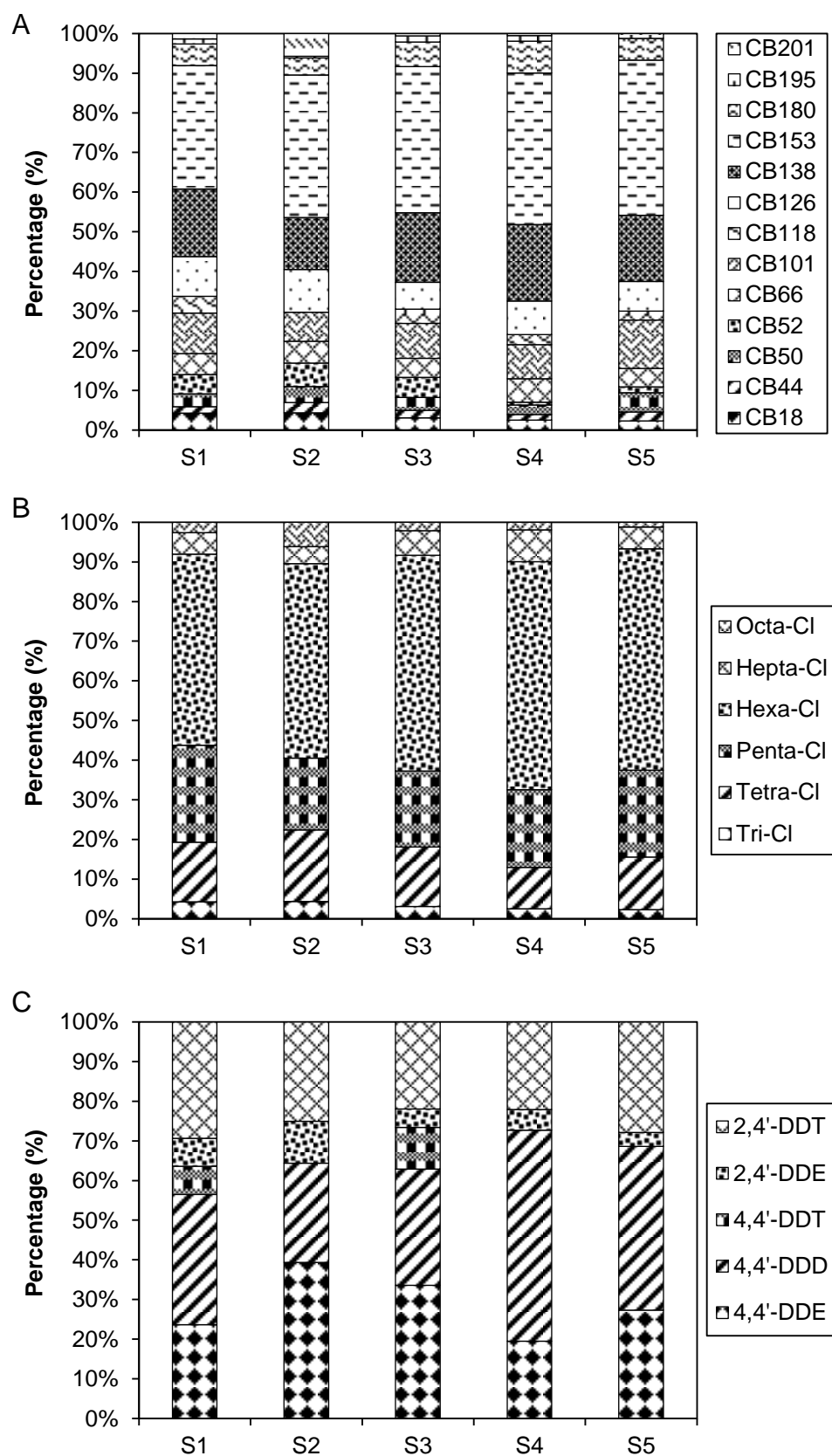


Figure IV.1.2 Profile of contamination of mussels from the Bizerte lagoon by (A) PCBs and (B) different Cl-substituted PCBs and (C) DDTs.

IV.1.3.3.2 Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)

Accumulation of PBDEs was much lower than that of PCBs and DDTs, with the highest value recorded at the station S3 ($4.9 \pm 0.1 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$). The only congener measured above the detection limit was BDE 47 (Table IV.1.1).

IV.1.3.3.3 Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

Table IV.1.2 shows individual PAH concentrations (on a dry weight basis) measured in the soft tissue of mussels from the Bizerte lagoon sites. Some PAH compounds, such as BeP, BaP, Per, and DA were absent in the studied samples, while some others such as Phe and Pyr were found at high concentrations. Phe, Pyr, Ch, and Flu reached high concentrations at S3. Elevated levels of Phe were also observed at S1 and S5. Total PAH concentrations varied from $47.5 \pm 3.2 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ to $390.0 \pm 57.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$, with an average concentration of $169.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$. Maximum PAHs levels were found in site S3 ($390.0 \pm 57.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$), the next highest in site S1 ($141.1 \pm 13.6 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) and site S4 ($139.2 \pm 6.9 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$). Significant differences were observed between stations S1 and S2, and between S3 and the remaining stations ($p < 0.05$). Significant differences in PAH distribution can be seen in Table IV.1.2. Low molecular weight PAHs (2 + 3 rings) were predominant (53.5 – 69.3 %) at sites S1, S2, S4 and S5, while 4 ring PAHs (> 60 %) were mainly present at station S3. For all sites, there were less high molecular weight PAHs with 5 + 6 rings. Percentages ranged from 1.13 to 17.82 %. The Phenanthrene/Anthracene (Phe/Ant) and Fluoranthene/Pyrene (Flu/Pyr) ratios currently used to identify the origin of PAHs, showed that PAH sources are different around the Bizerte lagoon (Table IV.1.2). At site S5, PAHs are mainly petrogenic in origin (Phe /Ant ratio > 10 and Flu /Pyr ratio ≤ 1), while the origins of those detected at the other stations are both petrogenic and pyrolytic (Phen/Ant and Flu/Pyr ratios < 10 and > 1, respectively).

Table IV.1.2 PAH concentrations (ng g⁻¹ dw, mean \pm SD) in the soft tissues of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected at five sites from the Bizerte lagoon.

Site	S1	S2	S3	S4	S5
Nap	5.7 \pm 1.7	1.8 \pm 1.4	7.3 \pm 3.0	5.6 \pm 1.7	3.0 \pm 1.2
Acy	<lod	2.0 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1	<lod	<lod
Ace	<lod	<lod	8.2 \pm 1.0	<lod	8.0 \pm 1.0
Fl	15.1 \pm 2.9	5.5 \pm 0.5	12.8 \pm 3.7	14.2 \pm 1.4	9.0 \pm 7.9
DBT	10.4 \pm 1.7	2.8 \pm 0.8	11.6 \pm 1.8	13.0 \pm 0.9	6.6 \pm 5.0
Phe	61.3 \pm 8.1	18.9 \pm 2.7	66.9 \pm 6.2	57.5 \pm 4.3	40.4 \pm 29.7
Ant	<lod	2.0 \pm 0.1	<lod	<lod	1.9 \pm 0.1
Flu	5.8 \pm 0.9	3.6 \pm 0.5	73.7 \pm 26.4	6.1 \pm 4.3	12.3 \pm 5.4
Pyr	12.9 \pm 1.5	7.5 \pm 1.9	102.9 \pm 35.5	14.0 \pm 3.7	11.9 \pm 3.4
2,1BNT	1.6 \pm 0.6	<lod	6.0 \pm 2.7	1.8 \pm 0.2	1.8 \pm 0.2
BaA	<lod	<lod	13.9 \pm 2.1	2.4 \pm 0.4	2.0 \pm 0.1
Ch	14.7 \pm 2.0	2.5 \pm 0.8	56.2 \pm 2.0	13.5 \pm 0.8	14.7 \pm 1.3
BF	12.6 \pm 1.8	0.6 \pm 0.4	21.2 \pm 4.4	9.1 \pm 1.9	15.1 \pm 2.0
BeP	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
BaP	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
Per	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
DA	<lod	<lod	<lod	<lod	<lod
IP	<lod	<lod	1.7 \pm 0.7	0.6 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
BP	1.0 \pm 0.1	0.3 \pm 0	2.4 \pm 0.8	1.4 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
Σ PAHs	141.1 \pm 13.6 (b)	47.5 \pm 3.2 (c)	390.0 \pm 57.3 (a)	139.2 \pm 6.9 (bc)	128.9 \pm 37.7 (bc)
Flu/(Flu + Pyr)	0.31 \pm 0.01	0.33 \pm 0.04	0.42 \pm 0.00	0.28 \pm 0.08	0.50 \pm 0.05
Ant/(Ant + Phe)	nd	0.10 \pm 0.01	nd	nd	0.06 \pm 0.03
Phe/Ant	nd	9.57 \pm 1.17	nd	nd	20.94 \pm 15.90
Flu/Pyr	0.45 \pm 0.02	0.50 \pm 0.09	0.71 \pm 0.01	0.41 \pm 0.18	1.00 \pm 0.17
2 + 3 rings (%)	65.5	69.3	28.7	64.9	53.5
4 rings (%)	24.8	28.7	64.8	27.1	33.1
5 + 6 rings (%)	9.6	2.0	6.5	8.0	13.4

Values in the same row marked with different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

<lod: below the limit of detection.

BF = BbF + BjF + BkF.

Ch = Chry + Triph.

DA = DahA + DacA.

IV.1.3.4 Biochemical analyses

Figure VI.1.3 displays the variations of GST, CAT and AChE activities in gills of mussels as a function of collection site.

The GST activity in S3 (372.7 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein) was significantly higher than the activity registered at S2 and S5 sites ($p < 0.05$). No significant changes were observed in GST activity in mussels from sites S1, S2, S4 and S5 (277.2 to 348.7 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein) (Figure IV.1.3A).

AChE activity ranged from 8.5 to 9.8 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein at sites influenced by anthropogenic activities (S1, S3 and S4) and from 12.6 to 16 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein at S2 and S5 which are considered as reference sites (Figure IV.1.3B). Significantly lower AChE activity was found in mussels at sites S1, S3, and S4 compared to the reference site S2 ($p < 0.01$).

No differences were observed in CAT activity between the five stations, with values ranging from 25.0 to 28.1 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein (Figure IV.1.3C).

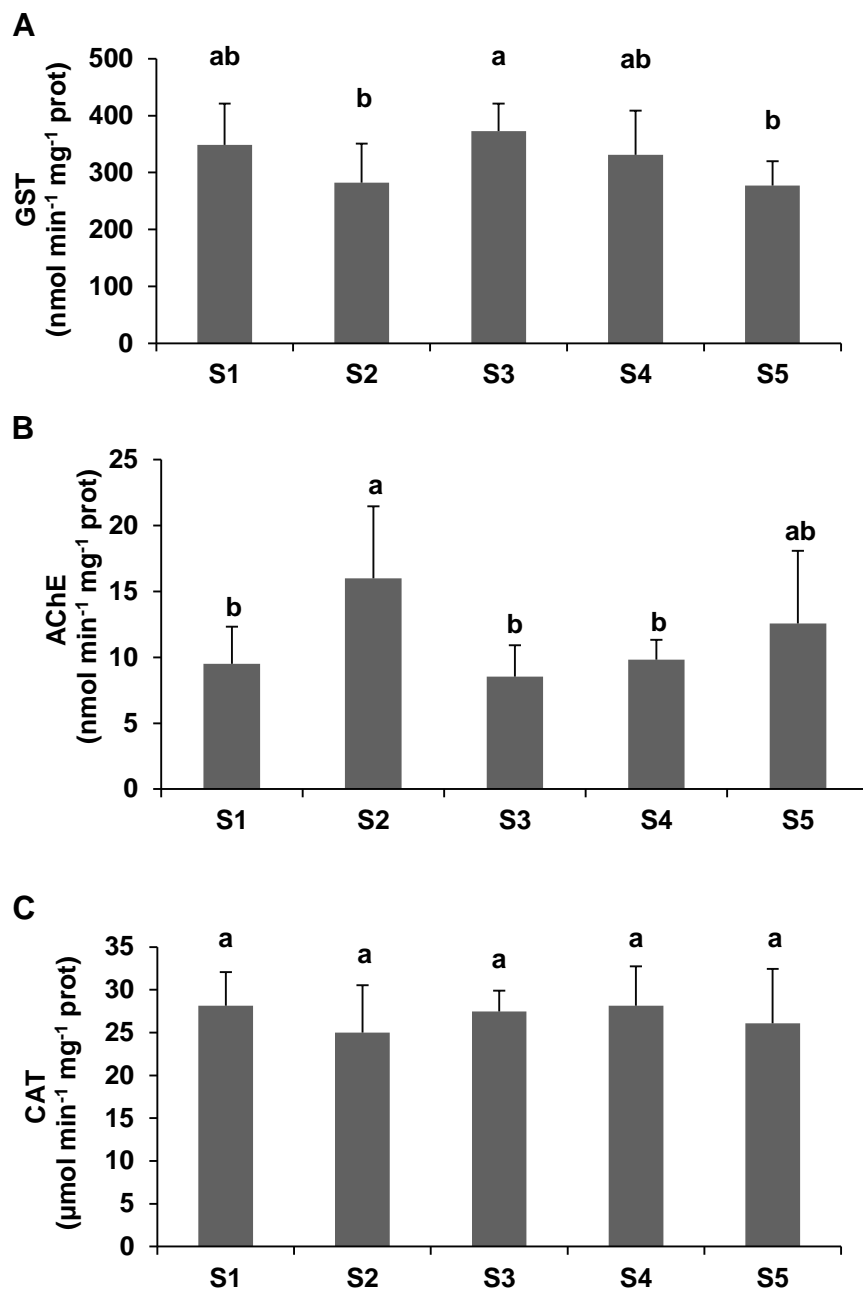


Figure IV.1.3 GST (A), AChE (B) and CAT (C) activities (mean \pm SD) in the gills of mussels *Mytilus galloprovincialis* collected from the Bizerte lagoon. Different letters indicate significant differences between stations, (Anova, $n=10$, $p < 0.05$).

IV.1.3.5 Relationship between chemical and biochemical parameters

Results from the correlation analyses are shown in Table IV.1.3. With regard to organic contaminants, GST and AChE displayed positive and negative correlations with Σ DDT, respectively. CAT activity was inversely correlated to AChE activity and CI levels. Also, AChE activity was inversely correlated to GST activity. For the environmental variables, pH was significantly correlated to Σ DDTs, AChE and GST activity, whilst its correlation with CAT came close to statistical significance ($r = -0.876$, $p > 0.05$). Temperature was correlated positively to the levels of Σ DDTs and GST activity, and negatively to AChE activity. Salinity levels were inversely correlated to Σ PAHs and Σ PCBs. Lastly, Σ PCBs was positively correlated to the levels of Σ PAHs.

Table IV.1.3 Pearson correlation coefficients among the different biological (CI, LC), biochemical (AChE, CAT, GST), chemical (HCB, Σ PAHs, Σ PCBs, Σ DDTs) and environmental (T°C, Sal, pH) variables tested across sites (n = 5).

	CI	AChE	CAT	GST	HCB	Σ PAHs	Σ PCBs	Σ DDTs	T	Sal	pH
LC	0.583	0.801	-0.652	-0.531	-0.043	-0.625	-0.513	-0.818	-0.801	0.541	0.804
CI	1	0.820	-0.948*	-0.709	0.639	-0.241	-0.266	-0.711	-0.652	0.190	0.797
AChE		1	-0.937*	-0.884*	0.494	-0.728	-0.675	-0.951*	-0.880*	0.636	0.993***
CAT			1	0.811	-0.701	0.461	0.413	0.815	0.722	-0.363	-0.876
GST				1	-0.497	0.779	0.839	0.919*	0.890*	-0.777	-0.904*
HCB					1	-0.018	-0.033	-0.268	-0.124	-0.068	0.413
Σ PAHs						1	0.959*	0.839	0.829	-0.969**	-0.768
Σ PCBs							1	0.833	0.850	-0.992***	-0.733
Σ DDTs								1	0.982**	-0.808	-0.980**

Numbers in bold indicate significant correlations. Asterisks indicate the signification of the correlations: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

IV.1.3.6 Principal component analysis (PCA)

The PCA of biological (LC, CI), biochemical (AChE, CAT, GST), chemical (HCB, Σ PAHs, Σ PCBs, Σ DDTs) and environmental (T, Sal, pH) data produced three principal components that accounted for 98.7 % of the total variance. The plot of variable vectors for the first two principal components PC1 and PC2 that explained 91.9 % of the total variance is shown at Figure IV.1.4A. The third component took into account only 6.7 % and was therefore excluded, because it did not provide any significant additional information. PC1 accounted for 73 % of the total variance and was influenced by the CAT, GST, PAHs, PCBs, DDTs, and temperature on the positive part and LC, CI, AChE, Sal and pH on the negative part. PC2 explained 19 % of the total variance and was correlated only with HCB on the

negative part. The plot of scores for different sites for the two principal components PC1 and PC2 separated three groups of sites (Figure IV.1.4B). S2 and S5 (First group), S1 and S4 (Second group) and the third group (S3).

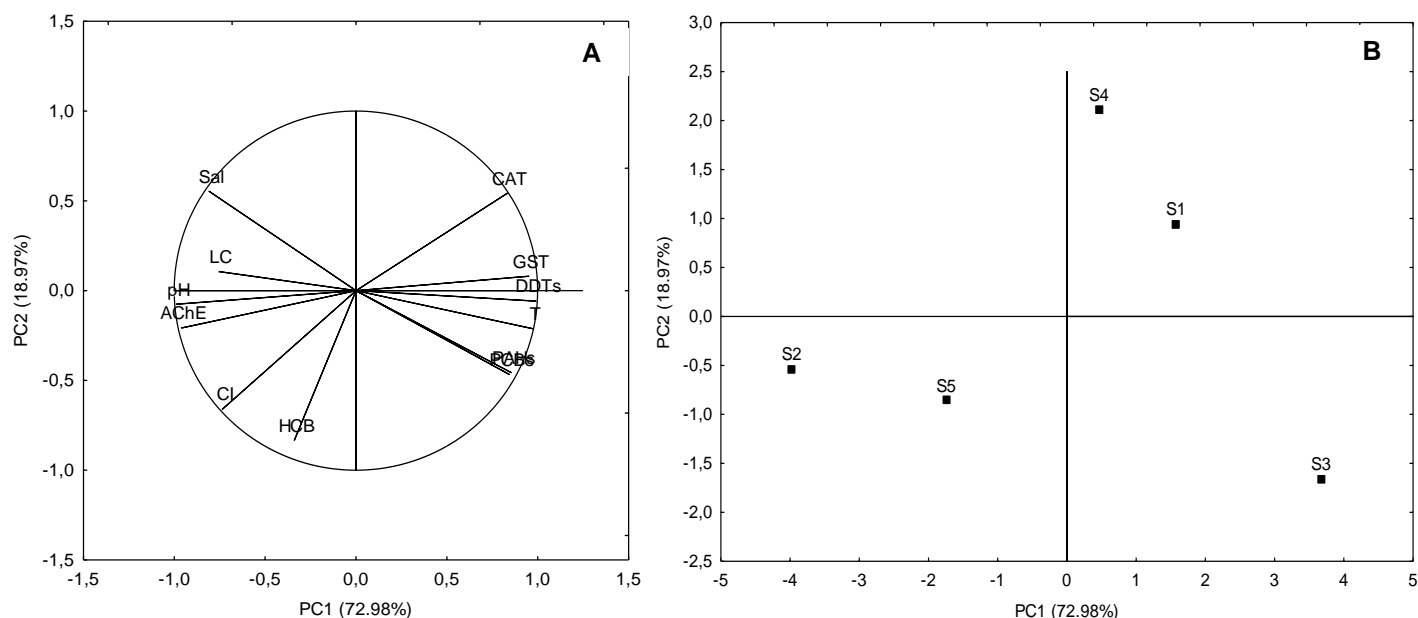


Figure IV.1.4 Results of the PCA of the two principal components produced by biological (CI), biochemical (AChE, CAT, GST), chemical (HCB, Σ PAHs, Σ PCBs, Σ DDTs) and environmental (T, Sal, pH) variables in mussels collected at five stations in the Bizerte lagoon. (A) Plot of variable vectors. (B) Plot of scores of different sites.

IV.1.4 Discussion

This study is (to our knowledge) the first time that chemical and biological measurements have been combined in this way in to monitor pollution in the Bizerte lagoon, using wild Mediterranean mussels (*M. galloprovincialis*) as an indicator organism.

Statistical comparisons of PAH body burden in mussel tissues (Table IV.1.2) showed significant differences ($p < 0.001$) between sites. More specifically, the contamination of S3 was higher and significantly different ($p < 0.001$) compared to all the other sampling stations, suggesting a possible higher exposure of native bivalves to PAHs, while limited differences were found among the other sites. For all other investigated POPs (Table IV.1.1), no significant differences were detected between locations. Stations S1 and S3, where the highest PAHs, PCBs and DDTs concentrations were measured, are located in the channel of Bizerte and close to the Haima River respectively. These highly populated areas see heavy boat traffic, and are characterized by agricultural and industrial activities, including oil refineries and cement manufacturing. Station S2 is also located in the channel, but we found that the concentrations of PAHs, PCBs and DDTs in mussels in this zone were lower than those

measured at stations S1 and S3. This can be explained by the sediment re-suspension phenomena, since sediments from the three stations had different concentrations of POPs. PCBs and DDTs concentrations at stations S1, S2 and S3 were respectively: 11.5 and 14.6 ng g⁻¹ dw, 0.4 and 1.8 ng g⁻¹ dw, 10.6 and 5.2 ng g⁻¹ dw (Barhoumi et al., 2013a). For PAHs, the significant difference of concentrations between station S1 (141.1 ± 13.6 ng g⁻¹ dw) and S3 (390.0 ± 57.3 ng g⁻¹ dw) can be explained by the position of station S1, which is close to the sea, where there are significant water exchanges. It should be noted that the high values of total DDT residue levels at site S1 and S3 could be a result of the discharge of untreated effluents from Bizerte City and agricultural areas located upstream in the Haima River catchment, transported and deposited in the downstream sediment.

Historically, chemical analyses of POPs in mussels have not been regularly monitored in the Bizerte lagoon, making it impossible to establish temporal trends for those contaminants. Nevertheless, the high levels of PCBs and DDTs quantified in mussel tissues from stations S1 and S3 during our study are consistent with other recent works, which reported higher concentrations of PCBs and DDTs in sediments from the same area (Barhoumi et al., 2013a). The levels of PCBs and DDTs found in our study are within the same range of values determined in *M. galloprovincialis* collected from Ría, NW Spain (Suárez et al., 2013). PAH levels are similar to those found by other authors along the NW Mediterranean coast (Villeneuve et al., 1999), along the North coast of Tunisia (Mzoughi and Chouba, 2012) and the NW Portuguese coast (Lima et al., 2007), but lower than reported in mussels from areas affected by oil spills or tanker accidents, such as the Prestige (Soriano et al., 2006), the Aegean Sea, at La Coruña (Porte et al., 2000), and the Erika, in the Bay of Biscay (Tronczynski et al., 2004). HCB concentrations were also similar to those reported by Deudero et al. (2007) in several invertebrate species from the Balearic Islands, Western Mediterranean.

Considering the toxicity of POPs to animals, it seems important to rank the sampling sites according to the concentrations of these compounds. Therefore, based on POP concentrations determined in the whole body of a given mussel, the ranking is: S3 (high contamination) > S1 and S4 (moderate contamination) > S2 and S5 (low contamination).

Based on the number of rings in the molecule, the predominant PAH compounds in mussels collected from the Bizerte lagoon (exception of station S3) were: 2 + 3 ring PAHs > 4 ring PAHs > 5 + 6 ring PAHs. One reason for the greater number of 2 + 3 ring PAHs in mussels could be related to their uptake pathway. The fewer rings number in PAHs molecule more they are water soluble and more they are bioavailable and could easily be taken up

through gill membrane or food ingestion. It could also be caused by the different of decontamination kinetics of each individual PAH (Rantamaki, 1997). Fleming et al. (2004) and Rocher et al. (2006) similarly found that low weight compounds (3 to 4 rings PAHs) are more bioaccumulated in *Mytilus sp* than 5 and 6 ring PAHs. In mussels from station S3, 4 ring PAHs represented about 65% of total PAHs. This result is in agreement with Baumard et al. (1998b) who report a 44% accumulation of 4 ring PAHs in mussels sampled in several stations close to the Mediterranean Sea. The significant differences in the pattern of PAHs between S3 and the remaining stations could be explained by variability of sources, hydrodynamic conditions, turbidity, or the presence of organic matter (river inputs) at different sampling sites.

In this study, different molecular ratios were proposed to provide information on the origin of PAHs. Calculating the above mentioned ratios (see section IV.1.3.3.3) for the data presented in Table IV.1.2 revealed that in four stations (S1, S2, S3 and S4), PAHs originated from both pyrolytic and petrogenic sources. These stations are located near harbours (Bizerte and Menzel Abderahmen Harbours) and received PAHs from petrogenic sources. Since these stations are located close to the cities of Bizerte and Menzel Abderahmen, urban discharges may also contribute to PAH inputs (mainly pyrolytic PAHs). Unlike other stations, S5 is less urbanized and located far from cities. This station probably receives PAHs from petrogenic sources by atmospheric deposition and water current. The identification of sources of PAHs still remains approximate, and must be done with caution, depending on metabolism of individual PAHs that are affected by species and trophic states.

With regard to the different PCB congener accumulation pattern found in the mussels (Figure IV.1.2C), our results agree with those reported by Suárez et al. (2013) who found that mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sampled in the Ría of Vigo accumulate mainly hexa and pentachlorobiphenyls (71.3 and 18.6 % respectively of the total PCBs). Similar percentages were also reported in bivalves and other marine organisms (Binelli and Provini, 2003; Catsiki et al., 2003; Storelli et al., 2006) and can be explained by slow biotransformation and excretion kinetics of congeners with higher degree of chlorination (Kannan et al., 1995; Van den Brink and Bosveld, 2001). The most abundant PCBs were hexachlorobiphenyls PCB 153 and PCB 138 accounting for 36 and 17 % of the total PCBs levels, respectively (Figure IV.1.2A). This indicates that mussels from the Bizerte lagoon were exposed predominantly to higher chlorinated PCB formulations. PCBs 153 and 138 are the main constituents in Aroclor 1254 and 1260 which were the most largely used commercial mixtures in several countries (Ivanov and Sandell, 1992; Barakat et al., 2002). The usage of PCBs in Tunisia is not well

established, but the use of PCBs in transformers, electrical equipment and other industries is common. Very active industrial facilities are located in close proximity to the Bizerte lagoon. Since the 1950s, around 100 industrial sites have opened in the immediate vicinity of the lagoon, the biggest being the cement factory (1950) and “El Fouledh” steelworks (1965). Until 1985, one company in Tunisia (SACEM, in the Menzel Bourguiba area) manufactured electrical transformers to meet national requirements. From 1970 to 1985, this company imported 900 tonnes of PCBs and manufactured approximately 908 transformers (APEK, 2005).

The relative concentration of the parent DDT compound and its biological metabolites, DDD and DDE, can be used as indicative indices for assessing the possible pollution sources. Since DDT can be biodegraded in aerobic conditions to DDE and in anaerobic conditions to DDD, ratio of $(DDE+DDD)/\Sigma DDT > 0.5$ can be indicative of long-term weathering (Hites and Day, 1992; Zhang et al., 1999). Figure IV.1.5 illustrates the relationship between $(DDE+DDD)/\Sigma DDT$ and DDD/DDE in mussels collected from the Bizerte lagoon. Ratios of $(DDE+DDD)/\Sigma DDT$ ranged between 0.64 and 0.78, indicating that the degraded metabolites formed a significant proportion of total DDT compounds. Also, most values of DDD/DDE ratio were greater than unity, indicating that soft tissue in mussels was dominated by 4,4'-DDD, the product of anaerobic degradation of 4,4'-DDT. The results obtained from the indices clearly indicate an old DDT pollution and suggest that there was no recent input of technical DDT from the agricultural areas into Bizerte lagoon following their ban in 1984. Ben Ameur et al. (2013b) reached the same conclusion for the aged input of DDTs based on concentration levels of DDTs in fish muscles.

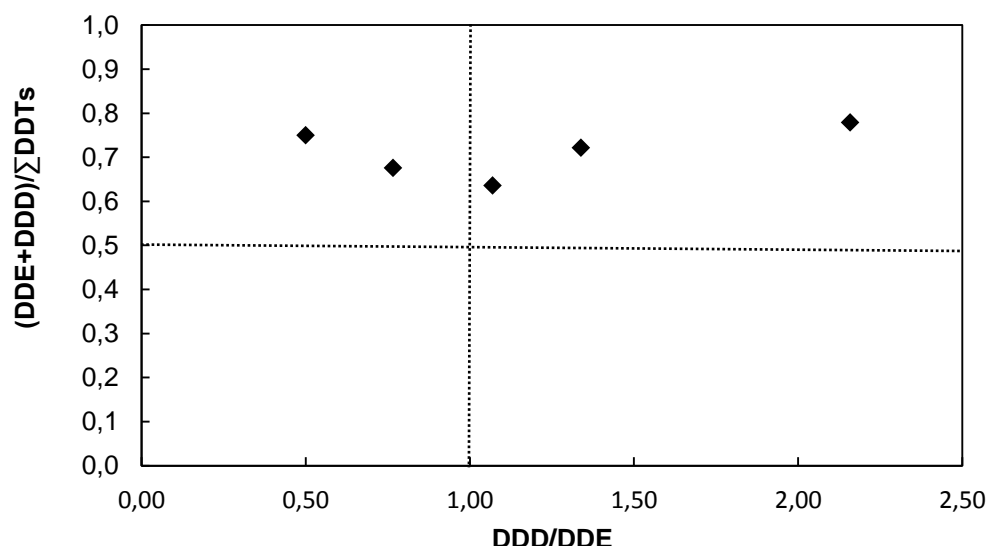


Figure IV.1.5 Relationship between $(DDE+DDD)/\Sigma DDTs$ and DDD/DDE in soft tissues of mussels collected from the Bizerte lagoon.

Environmental conditions such as salinity, temperature, pH and the amount of organic particles may affect the concentration and distribution of chemical contaminants in the water column, sediment and biota (Eggleton and Thomas, 2004). Also, organism physiology and tissue composition particularly lipid content, can affect the concentration and distribution of organic contaminants (Phillips and Rainbow, 1994; Baumard et al., 1999; Chu et al., 2003). In *Mytilus sp.*, lipid content varies depending on exogenous and endogenous factors such as food availability, energy reserves, and stage of reproduction (Gabbott, 1983; Ross et al., 2000; Bayne, 2004). Suárez et al. (2013) showed that the highest lipid content was observed in late winter, prior to the main spawning period and in late spring and early summer, coinciding with sexual rest and with an abundance of nutrients in the environment. This observation is concordant with our study showing higher levels of lipid content (13.7 to 20.9 %) in late winter (February). No correlation between lipid content and organic contaminant levels in mussel tissues was observed. So, the differences in the contamination levels of mussels between sampling sites cannot be explained by an increase of contaminant bioaccumulation due to a high lipid content of the tissues. Baumard et al. (1999) and Thompson et al. (1999) did not observe any relationship between lipid content and concentrations of PAHs, PCBs or DDTs in several bivalve species collected from the Western Baltic Sea and the Arcachon Bay, France.

In this study, a negative significant correlation was observed between PCBs, PAHs and salinity (Table IV.1.3), in a manner similar to that previously described by other authors

(Duursma et al., 1986; Suárez et al., 2013). This inverse relationship with salinity could suggest that river inputs (Haima, Tinja, Gueniche, Garek and Guenine Rivers) are the main entry of these pollutants into the Bizerte lagoon. The correlation of Σ DDTs with pH was significant ($p < 0.01$) in this study and can be explained by pH affecting the structure of OCPs causing their biodegradation (Wenzel et al., 2002). Eggleton and Thomas (2004) have shown that pH changes can accelerate the desorption, partitioning, bacterial degradation and oxidation of organic pollutants.

While chemical analyses give a qualitative and quantitative discrimination of pollution between sampled sites, they do not provide any information about the possible effects towards aquatic organisms. Measurements from only a few classes of contaminants may not be representative of the global chemical stress aquatic organisms are facing. Instead, the application of a suite of sensitive and integrative biomarkers could clearly differentiate between healthy and stressed organisms (Brooks et al., 2011), allowing a more precise differentiation of pollution hazard and possible health risk for exposed organisms. Considering the widespread presence of pro-oxidants in environmental mixtures, and the well-known toxicity of reactive oxygen species (ROS), the application of oxidative stress biomarkers is recommended by OSPAR in biomonitoring programs. Overall, mussel health status seems to be notably affected by the whole contaminant mixture of the Bizerte lagoon (Figure IV.1.3). This is particularly evident in bivalves from the most polluted site (S3), which showed significant increase of GST activity ($p < 0.05$) compared to control (S2 and S5). The GST enzyme activity has been suggested as a useful indicator of mussel exposure to organic pollutants (Fitzpatrick and Sheehan, 1993). Although some field studies have reported a significant induction of GST activity in mussels exposed to organic compounds (Moreira and Guilhermino, 2005; Rocher et al., 2006), others have detected little or no GST response (Fitzpatrick et al., 1997; De Luca-Abbott et al., 2005). The activation of GST activity in bivalves from S3 might be due to the high levels of DDTs accumulated in their soft tissues (Table IV.1.1), as confirmed by the significant ($p < 0.05$) positive correlations between the Σ DDTs and GST (Table IV.1.3). Our data was consistent with the findings of Parolini et al. (2013) who noticed a significant correlation between induction of GST and Σ DDTs in soft tissues from Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) exposed to an organochlorine mixture. In this regard, GST has been found to play an important role in the conjugation of electrophilic compounds with glutathione, and these reactions are of vital importance for the detoxification of xenobiotics (Kaaya et al., 1999).

AChE is an enzyme involved in recycling of acetylcholine, a neuromediator of cholinergic nerves. Numerous studies reported AChE inhibition by various neurotoxic compounds such as organophosphate and carbamate pesticides (Bocquene and Galgani, 1998). The inhibition of this enzyme was also related to exposure to many other chemical groups, e.g. metals, hydrocarbons and detergents (Payne et al., 1996; Guilhermino et al., 1998; Elumalai et al., 2002). AChE inhibition has thus been suggested as indicative of general neurotoxic stress (Lehtonen et al., 2006). Our results showed decreased AChE activity not only at sites in areas influenced by agricultural practices where pesticide contamination would be expected (S3 and S5) but also at sites in areas receiving urban and industrial wastes (S1 and S4) where a wide variety of pollutants are found (Dellali et al., 2001b; Trabelsi and Driss, 2005; Louiz et al., 2008; Barhoumi et al., 2013). In fact, negative effects of organochlorinated pesticides on AChE activity can be hypothesized in our study for mussels from station S3, as confirmed by the significant ($p < 0.05$) negative correlation between AChE activities and the concentrations of Σ DDTs (Table IV.1.3). At stations S4 and S1, the inhibition of AChE activity in mussels may be related to complex pollution inputs from both industrial and domestic activities. In station S5, which is located far from urban and industrial sources of pollution, high AChE activity was recorded, which could indicate a lower level of contamination of this site by POPs (Table IV.1.1 and Table IV.1.2). The highest levels of AChE activity were found at station S2. This high AChE level was similar to those obtained by Mora et al. (1999) on *M. galloprovincialis* collected from a low polluted site at the Arcachon bay entrance (south-west of France). When compared with data from literature, the values from our study (between 9.5 and 16.0 nmoles min⁻¹ mg⁻¹ protein) are in the same magnitude order to those recorded (between 9.9 and 13.5 nmoles min⁻¹ mg⁻¹ protein) by Serafim et al. (2011) in mussels collected from the South coast of Portugal and by Dellali et al. (2001b) in mussels collected from the Bizerte lagoon (between 4.5 and 6.2 nmoles min⁻¹ mg⁻¹ protein).

No significant difference in CAT activity was observed between stations (Figure IV.1.3C). Lionetto et al. (2003) also found no difference in CAT activity levels between mussels collected from “clean” and polluted stations in the Salento Peninsula (Italy). The lack of difference between sampled stations may be caused by exposure to low or moderate oxidative stress and/or by biochemical adaptation of mussels to environmental conditions. Previous field (Regoli, 1998) and laboratory studies (Cajarville et al., 1997) reported “biochemical adaptation” in the CAT response of mussels (*M. galloprovincialis*) chronically exposed to pollutants. Other enzymes such as superoxide dismutases, glutathione peroxidase, and glutathione reductase were also shown to be involved in the anti-oxidant response of

pollutant-exposed bivalves (Ramos-Gómez et al., 2011; Di Salvatore et al., 2013; Parolini et al., 2013). Such enzymatic activities were not recorded in our study. Compared with data from the same region and from other parts of the world, values of catalase activity obtained in this study are similar to those reported by Dellali et al. (2001a) and Khessiba et al. (2001) in mussels from the Bizerte lagoon (station S2) and by Bocchetti and Regoli (2006) in mussels from the Adriatic Sea.

Biological responses are influenced by natural environmental factors. Previous studies using biomarkers pointed out the need to incorporate the effects of abiotic (temperature, salinity, diet, etc.) and biotic factors (reproduction cycle, growth, age, sex, etc.) to correctly interpret biomarker responses (Smolders et al., 2002; Damiens et al., 2004).

Mussel populations in the study area were subjected to different water temperature, salinity, pH, and food availability. Temperature and salinity patterns along the Bizerte lagoon are influenced by two main currents, water currents from the Mediterranean Sea, which enter the lagoon through the Bizerte channel and increase water salinity from 33 psu (Zaouali, 1974) to 36.09 psu (Aïssa, 1991), and currents from the Ichkeul Lake, which enter the lagoon through the Tinja River.

The condition index (CI) of mussels collected in the Bizerte lagoon was high in all stations with the exception of S2. It was shown that CI is strongly linked to the availability of food resources (Mourgaud et al., 2002). The CI values obtained in the present study were higher than those obtained from other areas (Box et al., 2007) confirming that nutrient availability in the waters of the Bizerte lagoon is high. In addition, a significant negative relationship was observed between CI and CAT. Similarly, CAT activity was shown to significantly decrease in the clam *R. decussatus* when food was available (Roméo et al., 2003). When food is regularly available, animals have better physiological conditions and their background level of anti-oxidant defences may be lower.

Due to their sessile condition and filter feeding habits, bivalves might be particularly sensitive to changes in environmental conditions such as temperature, pH and salinity. For this reason temperature, pH and salinity were recorded at each sampling site.

Salinity is an environmental factor which changes from one region to another. It has been suggested that this fluctuation may influence the capacity of mussels to handle oxidative stress (Prevodnik et al., 2007). Fluctuations in biochemical responses have also been reported under hypo saline stress in *M. galloprovincialis* (Hamer et al., 2008). Nevertheless, the range of salinity variations detected in our study area seems to be insufficient to elicit any disturbance in the biochemical responses.

Concerning temperature, it was positively correlated with GST and negatively with AChE activity, respectively. Influence of temperature on enzyme activities has already reported by other authors in different bivalve species (Dellali et al., 2001b; Pfeifer et al., 2005; Duarte et al., 2011).

Although the range of temperatures recorded in this study could not be regarded as high thermal stress (very little temperature difference observed between sites), they can be considered an additional stress to pollutant exposure. In addition, it has to be taken into account that gills are in direct contact with water, meaning that epithelium cells could be highly sensitive to water temperature fluctuations. Indeed, Regoli and Principato (1995) have shown that gills are more susceptible to changes in environmental parameters and more prone to oxidative stress than other tissues.

In a similar way to temperature, GST and AChE activities were also shown to be correlated to pH. Ben-Khedher et al. (2012) have also documented a significant negative correlation ($r = -0.925$, $p < 0.01$) between pH and GST activity in gills and digestive gland of crabs (*Carcinus maenas*), collected from Bizerte lagoon.

PCA allowed identification of variables that had a major contribution to the total variance of the data set. Among all the studied parameters, POP concentrations appeared as driving factors for spatial variations, revealing three groups of stations. The first one includes mussels from stations S2 and S5 with low PAHs, PCBs, and DDTs body burden, and high CI and AChE activity. The second one encompasses stations S1 and S4 with moderate POPs levels and CI, high CAT activity and low AChE activity. Lastly, mussels from station S3 which are characterized by high PCBs, PAHs, and DDTs body burden, moderate CI, and induction of GST and AChE inhibition.

IV.1.4 Conclusions

By combining chemical and biological measurements, this study provides concordant information on the presence of contaminants and induced biological effects in mussels from the Bizerte lagoon. The battery of parameters applied in this study, including GST, CAT, and AChE activities in gills and POPs, and lipid quantification in the whole body of mussels. This study allowed three groups of stations within the Bizerte lagoon to be identified according to the chemical contamination levels and biological responses in mussels. The inter-station variations of biomarker responses were associated with chemical contamination and fluctuations in abiotic (pH, salinity and temperature) and biotic (condition index) parameters.

These results demonstrate that *M. galloprovincialis* constitutes a suitable bioindicator species for pollution biomonitoring in the Bizerte lagoon and in other coastal marine areas of the Mediterranean sea. This work represents the first step towards a new monitoring program that is being developed in *M. galloprovincialis* along the Bizerte lagoon to both evaluate contamination and environmental risks of POPs.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia for its financial support.

IV.2 Article 5: Pollution biomonitoring in the Bizerte lagoon (Tunisia), using grass goby, *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei, Gobiidae) as a bioindicator species

Badreddine Barhoumi ^{ab}, Christelle Clérandeau ^b, Karyn Le Menach ^b, Yassine El megdiche ^a, Laurent Peluhet ^b, Hélène Budzinski ^b, Mohamed Ridha Driss ^a, Jérôme Cachot ^{b,*}

^a Laboratory of Environmental Analytical Chemistry (05/UR/12-03), University of Carthage, Faculty of Sciences of Bizerte, 7021 Zarzouna, Bizerte, Tunisia

^b University Bordeaux 1, CNRS, UMR EPOC 5805, avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France

Marine Environmental Research, submitted.

Abstract

In this study, biological responses and contaminant levels in biological tissues were investigated in grass goby fish specimens (*Zosterisessor ophiocephalus*) collected from five stations in a moderately polluted ecosystem, namely the Bizerte lagoon on the north coast of Tunisia. The following biomarkers were measured: muscular acetylcholinesterase (AChE), hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), lipoperoxidation (TBARS), condition factor (CF), and hepatosomatic index (HSI). These measurements were taken in parallel with the content of organochlorines (OCPs and PCBS) and PAHs in muscle tissue. Total PAH concentrations ranged from 20.09 ± 0.68 to 105.77 ± 42.58 ng g⁻¹ dw, PCB from 33.19 ± 6.25 to 126.28 ± 7.37 ng g⁻¹ dw, and OCP from 11.26 ± 1.62 to 19.17 ± 2.06 ng g⁻¹ dw. The highest levels of pollutants and biomarkers were observed at station S1, located in the Bizerte channel. Elevated EROD, GST and CAT activities, as well as TBARS levels in goby livers were positively correlated with tissue contaminant levels at station S1. Significant negative correlations were also found between HCB and DDTs body burden with AChE activity in muscle at station S2. The integration of biological responses and contaminant tissue content indicated that certain areas of the Bizerte lagoon, notably station S1, are significantly impacted by various human activities, which likely represent a threat for aquatic wildlife. On the basis of these results, and due to its

ecological characteristics, the grass goby appears a suitable indicator species for pollution biomonitoring in coastal marine areas along the Mediterranean Sea.

Keywords: Organic pollutants; Bioaccumulation; Biomarkers; Grass goby; Bizerte lagoon

IV.2.1 Introduction

Coastal and lagoon areas are very productive ecosystems with high biodiversity, and therefore considered to be of great ecologic and economic value (Costanza et al., 1997). Despite their productivity, lagoons are under great anthropogenic pressure. Indeed, industries and urban settlements usually develop in coastal areas, exerting great pressure on marine ecosystems (Kennish, 2002).

When organic and inorganic contaminants are present in lagoons, pollution monitoring and risk-assessment procedures are essential in ensuring the preservation of their biological function (Adams, 2002).

Current development focuses on monitoring methods that can evaluate the biological and ecological consequences of pollution beyond environmental chemical characterization (Van Der Oost et al., 2003). Integrated use of chemical analysis and biochemical responses is one way to assess the impact of anthropogenic contaminants in aquatic systems, particularly on fish (Livingstone et al., 1992; Ferreira et al., 2004; Fernandes et al., 2007).

In the last few decades, progressive economic development along the Mediterranean coastline and in lagoons has resulted in substantial changes taking place in northern Tunisia. One such lagoon is Bizerte, located in a heavily industrialised area of northern Tunisia (Fig. 1). It receives large inputs of contaminants (organic chemicals, heavy metals and oil) from industry (cement works, metallurgical industry, boatyards, and tire production factories) and agriculture, as well as treated and untreated municipal sewage (Louati et al., 2013). Much of the pollution load is introduced into the lagoon via rivers. A variety of chemical toxicants, originating from both natural and anthropogenic sources [e.g., PAHs, polychlorinated biphenyls (PCBs), pesticides and heavy metals], are present in the lagoon of Bizerte (Ben Said et al., 2010; Garali et al., 2010; Barhoumi et al., 2013a,b). Persistent Organic pollutants (POPs) such as PCBs, PAHs, and organochlorine pesticides (OCPs) are the main pollutants studied in the lagoon of Bizerte because of their persistent character, bioaccumulative potential and their association with adverse effects in both humans and wildlife (UNEP, 2009; Wan et al., 2010).

Organic contaminants and heavy metals can easily enter the food chain, and are accumulated in aquatic biota (McCarthy and Shugart, 1990; Livingstone, 1993). Results of chemical analyses have in the past provided information on concentrations of contaminants in marine organisms, but failed to indicate the biological effects of contaminants (Walker, 1995). Biological indicators of exposure to toxicants or of adverse effects (biomarkers), have therefore also been introduced (McCarthy and Shugart, 1990; Peakall, 1992). Specifically, effects recognised at the biochemical level are generally used as “early warning” signals for assessing the influence of contaminants on organisms (Haux and Forlin, 1988). It has also become evident that instead of using single biomarkers, it is more appropriate to apply them as a battery.

In the Bizerte lagoon, a number of studies have investigated levels of POPs in biological tissues (Ben Ameer et al., 2013a, 2013b) and sediments (Derouiche et al., 2004; Trabelsi and Driss, 2005; Barhoumi et al., 2013). Nevertheless, the chemical monitoring of this impacted environment is restricted to the identification of a limited number of compounds, and does not provide information on their biological significance, i.e. on their effects on biological communities (Livingstone et al., 1992). To overcome this limitation, this paper focuses on the evaluation of the relationships between contaminant exposure and biological effects in aquatic organisms. This is the first study, combining chemical and biological measurements, to assess environmental quality in the Bizerte lagoon.

The specific aims of this study were to contribute towards improving the pollution monitoring strategy for the lagoon, and acquiring updated information on the levels of micropollutants and their probable biological effects in the grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Pisces, Teleostei, Gobiidae) using a battery of specific biomarkers.

The grass goby, *Zosterisessor ophiocephalus* (Pallas, 1811) is a demersal fish species belonging to the Gobiidae family. It is an endemic species found widely in estuaries and lagoons, as well as in the upper Adriatic Sea, the Black Sea, and the Sea of Azov (Miller, 1986). The ubiquity of this particular species, combined with its benthic and sedentary way of life, make it particularly suited to use in environmental biomonitoring programs. Several studies have confirmed that gobies are potential bioindicator species in ecotoxicological studies (Livingstone et al., 1995; Franco et al., 2002; Hajji et al., 2013). Gobies are sediment burrowers. This intimate contact with sediments promotes direct exposure to contaminants via particles or pore water. In addition, they are very sensitive to a large range of pollutants (Louis, 2010).

The concurrent use of several biomarkers is important to minimize misinterpretation in cases of complex situations of pollution (Minier et al., 2000; Flammarion et al., 2002; Pacheco and Santos, 2002; Deviller et al., 2005). The battery of biomarkers used in this study allowed the effects of pollution in an aquatic body with a variety of environmental contaminants to be evaluated. This battery included: (1) morphological and physiological measures of fish general condition, such as total length, weight, liver weight, condition factor (CF) and hepatosomatic index (HSI); (2) biotransformation enzymes involved in xenobiotic metabolism, such as phase I ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and phase II glutathione-S-transferase (GST); (3) antioxidant defense enzyme, catalase (CAT); (4) an indicator of synaptic neurotoxic effects, acetylcholinesterase (AChE) and (5) thiobarbituric acid reactive substrates (TBARS). Most of the measured enzyme activities were correlated to the organic pollutant content in fish muscle including hexachlorobenzene (HCB), DDT and its metabolites, PCB and PAH.

IV.2.2 Materials and methods

IV.2.2.1 Sampling sites

Grass goby (*Z. ophiocephalus*) were collected from five stations situated along the Bizerte lagoon (Figure IV.2.1). These stations were chosen because of differences in environmental conditions and levels of contamination (Barhoumi et al., 2013). Stations S1, S2, S3 and S4 are areas known to be impacted by pollution, while station S5 is a less polluted reference site (Figure IV.2.1). Stations S1 (37°15.48'N, 9°51.18'E) and S3 (37°13.33'N, 9°51.50'E) receive chronic inputs from urban runoff and sewage, while station S1 additionally receives industrial effluents from the cement factory. The station S2 (37°12.49'N, 9°47.90'E), is situated close to the mouth of Haima River in the northwestern part of the lagoon. The Haima River basin is characterized by intensive agricultural activity with extensive pesticide use. The S2 station is also impacted by the regular passage of cargo vessels between the city of Bizerte and Menzel Bourguiba. Station S4 (37°10.27'N, 9°49.37'E), is influenced by the waters from Ichkeul lake, and receives industrial effluents from the steel complex "El Fouledh". Lastly, the station S5 (37°09.51'N, 9°52.64'E), is located in the southeast part of the lagoon and is far from urban and industrial pollution sources but is influenced by agricultural inputs.

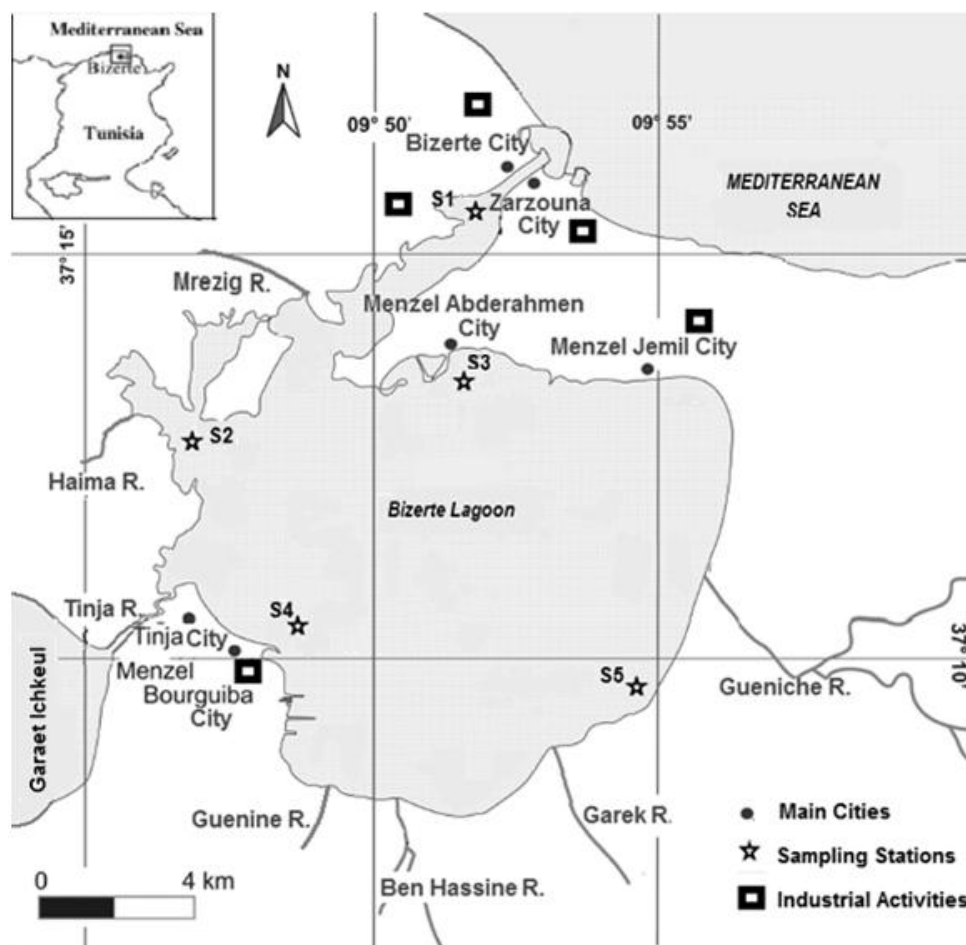


Figure IV.2.1 Map of the Bizerte lagoon with location of the five sampling stations.

IV.2.2.2 Sample collections and preparation

Pre-spawning female grass goby (24 per station) were captured in February 2012 using a trawl net. To limit biological variability (sex, size and age), the fish sampled were all female, and of a similar size (10.15 – 11.92 cm total length). They were kept in a 80L plastic tank and immediately transported (20–30 min) to the laboratory for sample collection and analysis. In the laboratory, total length and wet weight were measured for six fish per station. Fish were sacrificed by cervical dislocation, and the entire liver tissue was excised immediately. The gallbladder was removed, weighted, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for later analysis of EROD, GST and CAT activities and TBARS. A piece of muscle (2 cm³) was taken for the analysis of AChE activity and stored as above. The different biomarkers were analysed in six individual per station. For each determination of contaminants (OCs and PAHs), muscle tissues of 18 specimens from each station were dissected, pooled in 3 samples (each with tissue of 6 specimens), and stored at -20 °C until their freeze-drying and homogenization with a blender.

The following physico-chemical water properties were determined *in situ* at all five stations using a WTW-197i multimeter: temperature, salinity and pH.

IV.2.2.3 Chemicals

All reagents used for biomarker analyses were purchased from Sigma (France). The pesticide grade dichloromethane was purchased from Acros Organics (Noisy le Grand, France). Pentane was obtained from Atlantic Labo (Bruges, France), sulphuric acid Sharlau (95–98% extra pure) and iso-octane Sharlau were purchased from ICS (Gradignan, France). The copper (40 mesh, 99.5% purity, Aldrich, Strasbourg) was activated with hydrochloric acid (1 N) and then washed with water, acetone and CH₂Cl₂. The alumina (150 basic, type T particle size 0.063–0.2 mm) and the silica (Silica gel, particle size 0.063–0.2 mm) (Merck, Darmstadt, Germany) were washed with CH₂Cl₂ and activated for 14 h at 150 °C. The acid silica gel was prepared by mixing 600 g of silica gel and 400 g of sulphuric acid over night at 200 °C (Müller et al., 2001).

Standard reference materials SRM 2262 (chlorinated biphenyl congeners in isooctane) and SRM 2261 (pesticides in isooctane) were provided by the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). CB30, CB103, CB155 and CB198 were delivered as neat crystals by Promochem (Molsheim, France, Purity 99%). Octachloronaphthalene (OCN) was used as syringe standard and purchased from Ultra Scientific (North Kingstown, USA, Purity 95%).

The Standard Reference Material, SRM 2260, (24 aromatic hydrocarbons in toluene at 60 mg mL⁻¹) was provided by the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). The compounds used as internal standards for the quantification of PAHs were 9 perdeuterated PAHs. Naphthalene-d₈, dibenzothiophene-d₈, phenanthrene-d₁₀, anthracene-d₁₀, benzo[e]pyrene-d₁₂, benzo[a]pyrene-d₁₂ and benzo[ghi]perylene-d₁₂ were from Cambridge Isotope Laboratories (CIL, Andover, MD, USA), fluoranthene-d₁₀ and chrysene-d₁₂ from MSD isotopes (Division of Merck Frost Canada INC, Montreal, CND). Benzo(b)fluoranthene-d₁₂ and pyrene-d₁₀ were used as syringe standard and purchased from MSD isotopes (Division of Merck Frost Canada INC, Montreal, CND).

IV.2.2.4 Chemical analyses

IV.2.2.4.1 Extraction and clean-up

Muscle samples were freeze-dried and homogenized with a blender. The combined extraction protocol for organochlorinated compounds (OCs), PBDEs and PAHs was adapted

from Thompson et al. (2002), Tapie et al. (2008), Baumard et al. (1997) and Budzinski et al. (2000). The appropriate volumes of internal standard solution (PCB congeners 30, 103, 155 and 198 for PCBs and OCPs, perdeuterated PAHs for PAHs) were gravimetrically added to about 0.5 g of lyophilized muscle tissues. The sample was extracted using accelerated solvent extraction on an ASE 200 system (Dionex, Voisins le Bretonneux, France) with dichloromethane (Tapie et al., 2008). The parameters used during the extraction procedure were as follows: temperature (100 °C), static time (8 min), pressure (130 bars), heating time (5 min), flush volume (60%), and purge time (60 s). After extraction, the extract was concentrated using a RapidVap evaporator (Labconco, Kansas City, MO, USA) near 1 mL and first purified on alumina micro-column. The compounds were eluted with 3×5 mL dichloromethane. The extract was reconcentrated under a gentle flow of nitrogen, the solvent exchanged with isooctane, and evaporated again under nitrogen flow up to 1 mL. The extract was further purified on silica gel micro-column, previously conditioned with n-pentane. The alkane fraction was discarded by rinsing the column with n-pentane and the compounds were eluted with 3×5 mL n-pentane/dichloromethane (65/35; v/v). The extract was concentrated under nitrogen flow and transferred into GC vials containing a 300 µL glass insert. The deuterated PAH internal standard solution (pyrene-d10 and benzo[a]fluoranthene-d12) was gravimetrically added to the final extract. The latter extract was divided into two fractions, the first one was used for the analysis of PAHs by Gas Chromatography-mass spectrometry (GC/MS), and the second was purified on an acid silica gel column containing a bed of activated copper. OCs were eluted with 3×5 mL n-pentane/dichloromethane (90/10; v/v). The extract was then concentrated, transferred to isooctane and the syringe standard (OCN) was added before analysis by Gas Chromatography coupled to Electron Capture Detector (GC/ECD).

IV.2.2.4.2 Quantification of PAHs

The aromatic fraction was analysed by gas chromatography–mass spectrometry in SIM mode (GC–MS; HP 5890 Series II, MSD 5972, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) using an HP5-MS capillary column (5% diphenylsiloxane–95% dimethylsiloxane; 30m×0.25 mm×0.25µm; Agilent). The injector temperature was maintained at 280 °C. The GC temperature program was: from 50 °C (2 min) to 300 °C (8 min) at 10 °C min⁻¹. The carrier gas was helium, with a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. The GC was coupled to a HP 5972 mass selective detector (MSD) (electronic impact: 70 eV, voltage: 2000 V) operated under the

single ion monitoring mode (SIM) using the molecular ion of each compound at 1.23 scan/s. The interface temperature was 290 °C.

The PAHs were quantified relative to perdeuterated PAHs added to the samples prior to extraction. The response factors of the different compounds were measured by injecting a SRM 2260 solution spiked with the same solution containing the perdeuterated PAHs as the one used for spiking the muscle tissue. The studied PAH ranged from di-aromatic (Naphthalene) to hexa-aromatic (benzo[ghi]perylene) and included: Naphthalene (Nap); Acenaphthylene (Acy); Acenaphthene (Ace); Fluorene (Fl); Dibenzothiophene (DBT); Phenanthrene (Phe); Anthracene (Ant); Fluoranthene (Flu); Pyrene (Pyr); 2,1 Benzonaphthothiophene (2,1BNT); Benz[a]anthracene (BaA); Chrysene (Chry); Triphenylene (Triph); Chry plus Triph (Ch); Benzo[b]fluoranthene (BbF); Benzo[j]fluoranthene (BjF); Benzo[k]fluoranthene (BkF); BbF plus BjF plus BkF (BF); Benzo[e]pyrene (BeP); Benzo[a]pyrene (BaP); Perylene (Per); Dibenz[a,h]anthracene (DahA); Dibenz[a,c]anthracene (DacA); DahA plus DacA (DA); Indeno[1,2,3-cd]pyrene (IP); benzo[ghi]perylene (BP). The PAH concentrations are given on ng g^{-1} dw. Sample concentrations are expressed as nanograms per gram dry weight tissue (ng g^{-1} dw).

IV.2.2.4.3 Quantification of OCs

Separation and detection of OCs were performed using high-resolution gas chromatography (GC; Agilent 6890 Series gas chromatography system; Agilent Technologies, Philadelphia, PA, USA) equipped with a ^{63}Ni electron capture detector, and both PTE-5 (30 m×0.32 mm i.d., 0.32- μm film thickness) and HP1 (30 m×0.32 mm i.d., 0.25- μm filmthickness) capillary columns were used. The operating conditions were as follows: injector temperature, 270 °C; detector temperature, 300 °C; the GC temperature program was 70 °C (1 min hold) to 140 °C at a rate of 25 °C min^{-1} , 179 °C at 2 °C min^{-1} , 210 °C at 1 °C min^{-1} and then to 300 °C (10 min hold) at 5 °C min^{-1} ; carrier gas was hydrogen (H_2) set up at a flow rate of 1.5 mL min^{-1} ; detector make-up gas was nitrogen set up at a flow rate of 60 mL min^{-1} ; sample injection volume, 1 μL ; injection mode, split less (1 min). The data presented in this paper were obtained using the PTE-5 column, and a HP1 capillary column was used as second column to confirm the identification of OCs compounds in fish.

PCBs (SRM 2262) and OCPs (SRM 2261) were quantified in relation to internal standards (CB 30, CB 103, CB 155, CB 198). The relative response factors of the different compounds were determined by injecting standard solutions (SRM 2262 and SRM 2261) spiked with the same solution of internal standards as that used for spiking the samples.

IV.2.2.4.4 Quality control and quality assurance

To ensure quality assurance, procedural blanks were regularly performed during the extraction process. No pesticides or PCBs were found in blanks, but only low levels of the most volatile PAH (Naphtalene). Samples were therefore corrected for blanks only for the latter compound. Samples and blanks were spiked with internal recovery standards prior to extraction procedures and by syringe standard (OCN for OCs, Benzo(b)fluoranthene-d12 and pyrene-d10 for PAHs) before injection to monitor methodological analyte losses. Recoveries above 80% were accepted. Blank injections of isooctane were performed between each sample injection to ensure the cleanliness of the GC/ECD and GC/MS injector. Limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were calculated by the signal-to noise ratio (3 : 1 and 10 : 1, respectively) for each chemical class and were respectively 0.10 and 0.25 ng g⁻¹ dw for DDTs, 0.12 and 0.20 ng g⁻¹ dw for HCB, 0.02 and 0.10 ng g⁻¹ dw for PCBs and 0.10 and 0.20 ng g⁻¹ dw for PAHs.

IV.2.2.5 Biomarkers

IV.2.2.5.1 Condition index

Total length and weight were measured for each sampled fish, and used to calculate the Condition Factor (CF) and the Hepato-Somatic Index (HSI) according to the following formulas (van der Oost et al., 2003):

$$CF = (W_T/L^3)100$$

$$HSI = (W_H/W_T)100$$

where W_T = total wet weight (g), L = total length (cm) and W_H = liver weight (g).

IV.2.2.5.2 Enzymatic activity

Aliquots of 200 mg (wet wt) of goby liver tissue were homogenized in 0.1M phosphate buffer (pH = 7.7; 0.1M KCl) in the ratio of 1:3 (w/v). The homogenate was then centrifuged at 9000g at 4 °C for 20 min. The supernatant (fraction S9) was then collected in a clean microtube and stored at -80 °C before biochemical measurements.

The protein concentration in the S9 fraction was measured using Bradford's (1976) method with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Spectrophotometric measurements were performed in a Biotek Synergy HT microplate reader, and expressed as mg mL⁻¹.

EROD activity was determined using the Burke and Mayer method (1974). The reaction mixture consisted of a NaH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer (0.1 M, pH 7.5), 7-ethoxyresorufin (70 mM) and NADPH (5.57 mM). The change in fluorescence was recorded (excitation wavelength

530 nm, emission wavelength 585 nm) and enzyme activity calculated as $\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein using a resorufin standard.

GST activity was determined using the method developed by Habig et al. (1974) with some minor modifications. The reaction mixture consisted of 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 20 mM GSH, 20 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB and fraction S9 (10%) in a total volume of 1 mL. The change in absorbance at 25 °C was recorded at 340 nm and the enzyme activity was calculated as nmol CDNB conjugate formed $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein using a molar extinction coefficient of $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

CAT activity was assayed by the method of Claiborne (1985). The reaction mixture consisted of 100 mM phosphate buffer (pH 7.4), 30 mM hydrogen peroxide, H_2O_2 and 10% of fraction S9 in a final volume of 1 mL. Change in absorbance was recorded at 240 nm. CAT activity was calculated in terms of nmol H_2O_2 consumed $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein.

IV.2.2.5.3 AChE

Aliquots of 1 g (wet wt) of muscle tissue were homogenized in 0.1M phosphate buffer (pH = 7.0; 0.1% Triton X-100) in the ratio of 1:10 (w/v). The homogenate was then centrifuged at 10 000g at a temperature of 4 °C for 20 min. The supernatant (fraction S9) was collected and stored at -80 °C before use.

Measurement of AChE activity was performed using the colorimetric method of Ellman et al. (1961). The absorbance at 412 nm was recorded for samples and blanks. AChE activity was expressed in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein using a molar extinction coefficient of $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

IV.2.2.5.4 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined from the same homogenate used for enzymatic activity determination. The level of lipid peroxidation was determined by quantifying the concentration of 2-thiobarbituric acid reactive substrates (TBARS) using the Buege and Aust (1978). In this assay, 600 μL of fraction S9 was heated at 80 °C for 15 min in a solution containing 2% butylated hydroxytoluene (BHT), 20% trichloroacetic acid (TCA) and 0.8% 2-thiobarbituric acid (TBA). The tubes were then cooled, and after mixing, the TBARS level was quantified at 530 nm by using a microplate-reading UV-spectrophotometer (Biotek Synergy HT). Results were expressed in nanomoles of MDA equivalents per milligram of protein.

IV.2.2.6 Statistical analysis

Results of chemical (HCB, \sum DDTs, \sum PAHs, \sum PCBs and \sum POPs), biochemical (EROD, AChE, GST, CAT and TBARS) and biometric (CF and HSI) measurements were reported as mean \pm S.D. Data was initially tested for normality (Shapiro–Wilk test on residues with 1% risk) and equality of variance (Levene test, 5% risk). If conditions were respected, significant differences between treatments were tested with one way ANOVA analysis followed by a post-hoc Tukey test ($p < 0.05$). If conditions were not fulfilled, non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA followed by Bonferroni–Dunn post-hoc test were used ($p < 0.05$). Relationships between parameters were determined by parametric Pearson bivariate correlation analysis. Principal component analysis (PCA) was used to obtain an overview of the spatial distribution pattern of the different studied parameters and to assess the relative implication of these different parameters in among site differences. Statistical analyses of data were performed using the software STATISTICA 7.1 from StatSoft (Maison Alfort, France).

IV.2.3 Results

IV.2.3.1 Spatial distribution of contaminated fish

For all sites, the physico-chemical parameters of water during the sampling period were as follows: water temperature 13.84 ± 0.61 °C; pH 7.28 ± 0.18 and salinity 34.44 ± 1.18 psu. The mean concentrations of organic pollutants in fish muscle at each site are depicted in Figure IV.2.2. PAHs are classified according to their molecular weight, which can be either low (Nap, Acy, Ace, Fl, DBT, Phe and Ant), medium (Flu, Pyr, 2,1BNT, BaA and Chry + Triph), or high (BbF + BjF + BkF, BeP, BaP, Per, DahA + DacA, IP and BP). The highest total PAH concentration was found in fish from station S1 (\sum PAHs = $105.77 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) and the lowest in those from station S5 ($20.09 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$); the remaining stations showed a moderate PAH concentration ($28.52 - 83.97 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$). The predominant PAHs were two, three and four ring aromatic hydrocarbons, accounting for 100% of total PAHs. The high molecular weight PAHs, were below the limit of detection in all the studied stations. Thirteen congeners of PCBs were detected (Figure IV.2.2B). The predominant PCBs were high chlorinated biphenyls, and the sum of PCB 138 and PCB 153 represented more than 40% of the total PCBs at all sites. The highest PCB concentration was found in fish from station S1 (\sum PCBs = $126.28 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$), followed by S2, S3 and S4, and the lowest in those from station S5 ($33.19 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$). The measurement of HCB and DDTs are displayed in Figure IV.2.2C.

The fish from stations S1 and S2 presented higher total OCPs concentration (16.96 and 19.17 ng g⁻¹ dw, respectively) when compared to those from station S3 and S4 (11.26 and 11.81 ng g⁻¹, respectively). DDTs were predominant OCPs, which made up 98% of total OCPs.

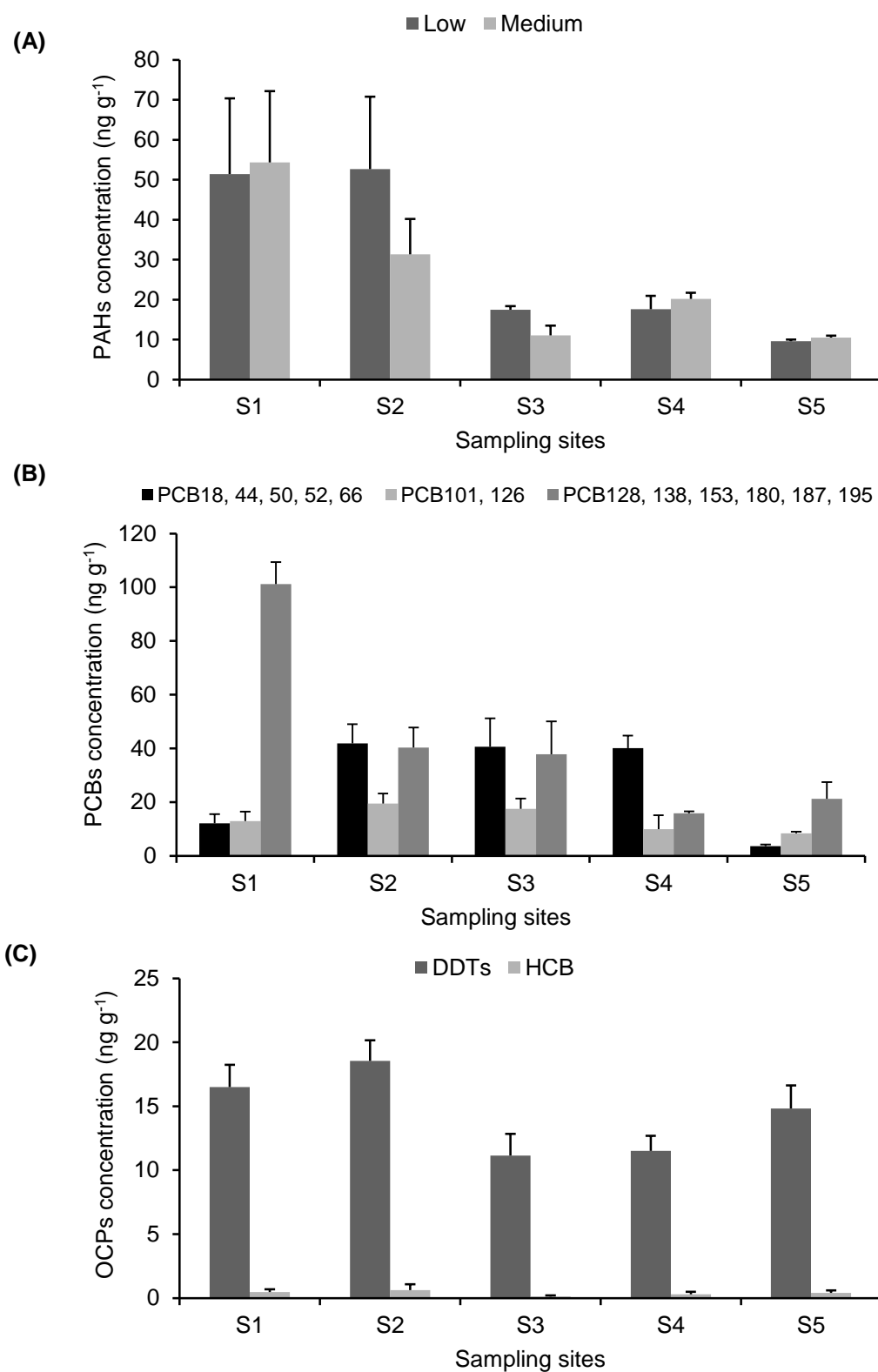


Figure IV.2.2 Concentrations (Mean \pm SD) of PAHs (A), PCBs (B) and OCPs (C) in grass goby muscle from five sites of the Bizerte lagoon (n = 3).

IV.2.3.2 Fish biometrics

The main biometric characteristics of the sampled fish are given in Table IV.2.1. No significant differences were observed in terms of mean total weight, total length, liver weight, condition factor (CF) and hepatosomatic index (HSI) for the fish sampled at the five studied stations. In addition, all fish were adult females caught prior to the spawning season. Thus any differences measured in the biomarkers were not a consequence of sex or size, and consequently these factors were excluded from the analysis.

Table IV.2.1 Averaged total length, weight, liver weight, condition factor (CF) and hepatosomatic index (HSI) of grass gobies from five sampled stations in the Bizerte lagoon.

	S1	S2	S3	S4	S5
Total length (Cm)	11.80 ± 1.35	11.92 ± 0.74	10.92 ± 1.06	10.15 ± 1.32	11.20 ± 0.93
Weight (g)	21.88 ± 6.99	21.45 ± 2.58	11.98 ± 4.60	14.16 ± 5.20	16.70 ± 4.09
Liver weight (g)	0.85 ± 0.55	0.50 ± 0.10	0.41 ± 0.17	0.55 ± 0.26	0.46 ± 0.11
CF	1.32 ± 0.26	1.25 ± 0.10	0.98 ± 0.44	1.31 ± 0.11	1.19 ± 0.20
HSI	3.64 ± 1.45	2.38 ± 0.49	3.45 ± 0.78	3.83 ± 1.01	2.81 ± 0.63

Mean ± SD; n = 6

IV.2.3.3 Biomarker analysis

The results for EROD, AChE, GST and CAT activities and TBARS levels in goby are presented in Figure IV.2.3.

EROD activity was significantly different in fish from the five stations (Figure IV.2.3B). The fish from station S1 had EROD activity at least three times greater ($98.23 \pm 12.17 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$) than fish from station S2 ($33.15 \pm 5.32 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$), while EROD activity in fish from the latter station was significantly higher than the three remaining stations ($p < 0.05$).

The AChE response in goby muscle tissue also shows significant differences between the five sampled stations (Figure IV.2.3A). There was a significant inhibition of AChE in fish from the station S2 ($12.17 \pm 3.70 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$) when compared with those from stations S4 ($27.44 \pm 12.17 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$) and S3 ($41.95 \pm 8.22 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$), while the latter station showed significant differences when compared to all studied stations ($p < 0.05$).

GST (Figure IV.2.3C) and CAT activities (Figure IV.2.3D) and TBARS levels (Figure IV.2.3E) displayed similar response patterns with significantly higher values ($p < 0.05$) in fish

from station S1, when compared with other stations and no significant differences between the four remaining stations.

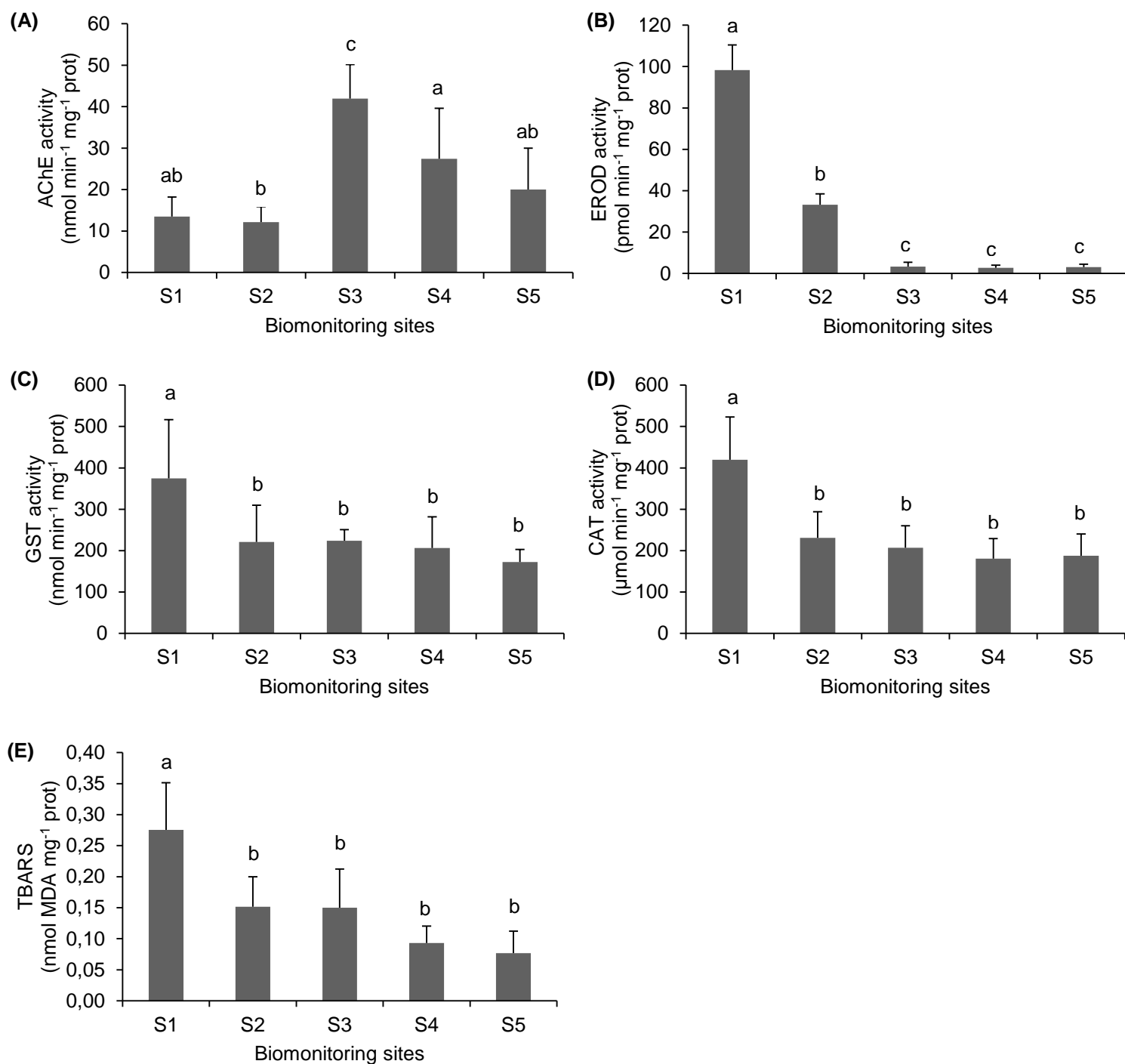


Figure IV.2.3 Responses of AChE, EROD, GST, CAT and TBARS in *Zosterisessor ophiocephalus* collected from the Bizerte lagoon. Different letters indicate significant differences between stations, p < 0.05.

IV.2.3.4 Correlation analyses

The correlation between biological markers and contaminants in muscle are shown in Table IV.2.2. There are significant positive correlations between EROD, GST, and CAT activities, TBARS levels, Σ PAHs, and Σ POPs concentrations. AChE activity was inversely correlated to HCB and Σ DDTs concentrations. GST and CAT activities were positively correlated and showed positive correlation with TBARS levels. Also, GST activity was significantly correlated to CAT activity. Lastly, TBARS levels were positively correlated to the levels of Σ PCBs and Σ POPs.

IV.2.3.5 Multivariate analysis

Principal component analysis (PCA) based on individual physiological/biochemical parameters (length, weight, liver weight, CF, HSI, EROD, AChE, GST, CAT and TBARS) and chemical contaminants (HCB, DDTs, PAHs, PCBs, POPs) gave a principal component (PC1) accounting for 64.7% of the variability amongst the data (Figure IV.2.4A). This PC was loaded most negatively (to the left) by HCB, DDTs, weight, length, PAHs, POPs, EROD, liver weight, CAT, TBARS, PCBs and GST and loaded to the right by AChE activity. The second PC (PC2) accounted for 22.4% of the variability in the data and was negatively loaded only by HSI and positively loaded only by HCB (Figure IV.2.4A).

The samples from the different locations scored differently on the principal components (Figure IV.2.4B). According to PC1 axis the sampling site S1 was clearly separated from the sites S3 and S4. According to PC2 axis the sampling site S2 was clearly discriminated from the site S1 and the sampling site S5 from the sites S3 and S4.

Table IV.2.2 Pearson correlation coefficients for chemicals (HCB, Σ DDTs, Σ PAHs, Σ PCBs, Σ POPs) and biological markers (EROD, AChE, GST, CAT, TBARS, CF, HSI) measured in grass goby specimens sampled at five stations in the Bizerte lagoon.

	CF	HSI	EROD	AChE	GST	CAT	TBARS	HCB	Σ DDTs	Σ PAHs	Σ PCBs	Σ POPs
CF	1	0.028	0.505	-0.060	0.363	0.401	0.219	0.682	0.480	0.567	0.092	0.364
HSI		1	0.142	0.451	0.401	0.251	0.241	-0.617	-0.682	-0.058	0.177	0.026
EROD			1	-0.610	0.951*	0.984**	0.940*	0.501	0.590	0.915*	0.757	0.881*
AChE				1	-0.349	-0.483	-0.333	-0.963**	-0.904*	-0.694	-0.170	-0.489
GST					1	0.978**	0.972**	0.223	0.324	0.822	0.820	0.852
CAT						1	0.964**	0.352	0.467	0.842	0.754	0.836
TBARS							1	0.253	0.408	0.842	0.886*	0.899*

Numbers in bold indicate significant correlations. Asteriks indicate the signification of the correlations: *p<0.05; **p<0.01.

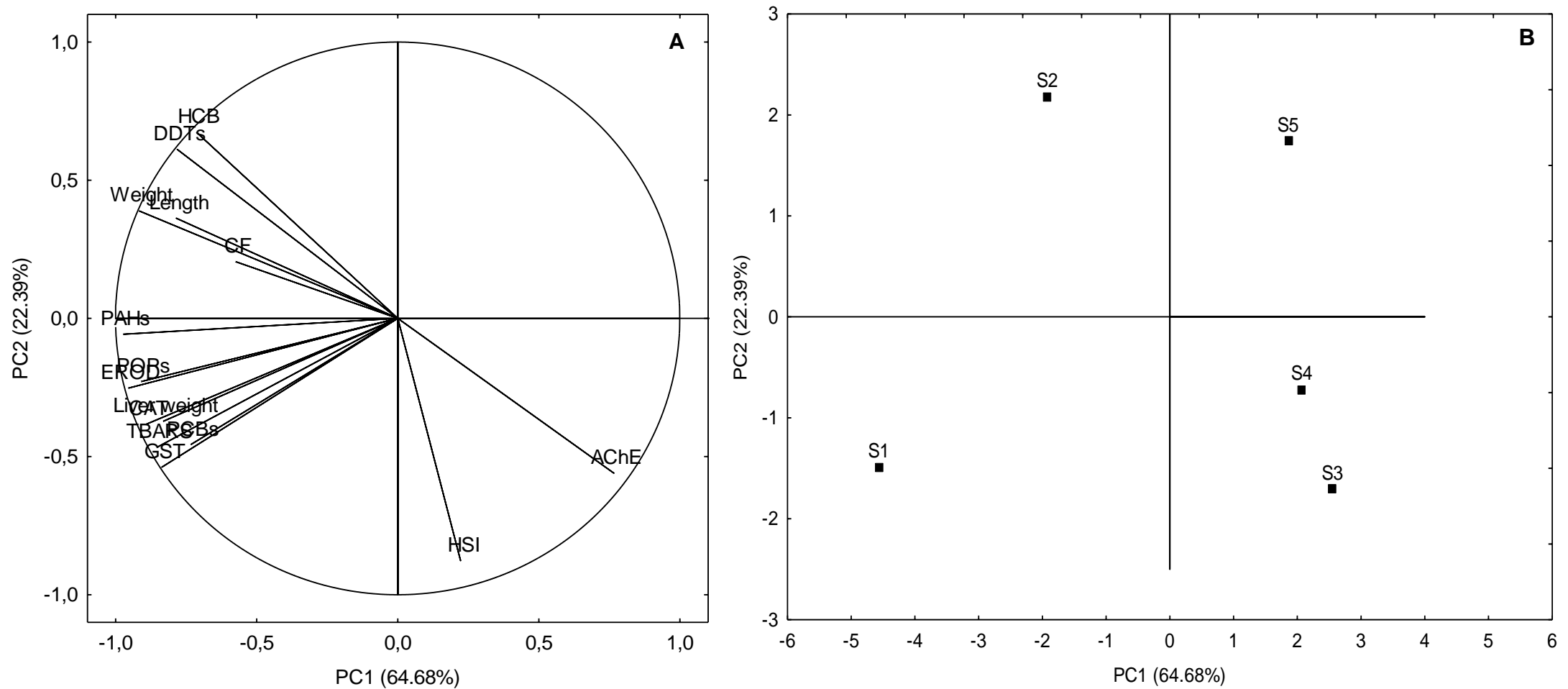


Figure IV.2.4 Component loading (A) and component score (B) plots from principal component analysis: distribution of samples from the different sites based on the pattern of environmental and biochemical parameters.

IV.2.4 Discussion

In this study, several chemical and biological markers were used to study accumulation and effects of pollutants in female *Z. ophiocephalus* living in five stations of the Bizerte lagoon, providing a preliminary overview of the health status of the population and the global quality of the ecosystem. The five sampling sites were chosen to represent a potential gradient of pollution. They were sampled at the same time of the year to minimize any seasonal effects.

Physico-chemical parameters may influence biomarker responses and distribution of chemical contaminants in biota (Eggleton and Thomas, 2004). Temperature variations may affect enzymes' catalytic efficiency and binding capacity (Hochachka and Somero, 1984) and may also disturb the oxygen balance in tissues. Biochemical responses can also be impacted under hypoosmotic stress (Hamer et al., 2008). In our study, the overall physico-chemical parameters of water did not change significantly between the different stations sampled. However, the profiles of organic pollutants as shown in Figure IV.2.2 in stations S1 and S2 were clearly different from those encountered at other stations. PAHs and PCBs were detected at higher levels in S1 compared with other sites, whilst the content of OCPs was the highest at S2. We can therefore hypothesize that fish from stations S3, S4 and S5 were less exposed to pollutants due to the various rivers opening into the lagoon of Bizerte and diluting pollution from the Bizerte channel (Haima, Tinja, Gueniche, Garek and Guenine Rivers). Pollution by persistent organic pollutants was relatively elevated in fish from the stations S1 and S2. These stations are located in the channel (between the narrow part and the arsenal of Menzel Bourguiba). This area is highly frequented by boats, highly populated, and characterized by industrial activities including oil refineries and lead and cement manufacturing. In particular, S2 is close to the Haima River, and it is likely that the high concentration of OCPs comes from the agricultural areas located upstream in the Haima River catchment, from where it could be transported and deposited downstream in sediments.

According to their molecular weight, the predominant PAHs are those of low molecular weight (2 to 4 rings). Several authors also found the highest accumulation of low molecular weight PAHs in fish and mollusc tissues (Narbonne et al., 1999; Storelli and Marcotrigiano, 2001; Rocher et al., 2006; Salazar-Coria et al., 2007). The preferential accumulation of PAHs is determined by their solubility and bioavailability, related to the octanol–water partition coefficient (K_{ow}), molecular weight, exposure route and ingestion of PAHs, which involves the way of life of native biota (Conell and Miller, 1984). Schrap and Opperhuizen (1990) revealed that PAHs with high K_{ow} values, such as pyrene and benzo[a]pyrene, bind more

efficiently to dissolved humic acid or to other dissolved organic material than those with low K_{ow} values (anthracene or phenanthrene). The number of rings has been reported to influence the metabolic velocities of PAHs. Indeed, the decrease was faster for PAHs of low molecular weight which are rapidly released in the aqueous compartment, than for PAHs of high molecular weight, which are strongly adsorbed in sediment particles.

The most predominant PCB congeners in muscle tissue corresponded to PCB138 and 153, which is consistent with most of the authors' findings relating to aquatic organisms (Lavado et al., 2006, Fernandes et al., 2008, Ben Ameer et al., 2013b). The 138 and 153 PCB congeners turned out to be the most abundant in aquatic environments due both to their high lipophilicity, stability, and low degradability that facilitate their adsorption to particles and their accumulation in sediments and biota (Naso et al., 2005).

The relatively high concentrations of DDTs species in this area are consistent with the extensive use of this pesticide for malaria control other sanitary purposes in Tunisia from the 1940s to the 1980s. In Tunisia, the old stockpiles of DDT were estimated at 45 tons (APEK, 2005) and were stored in unsatisfactory conditions. Ben Ameer et al. (2013b) and Hassine et al. (2012) have also found high concentrations of DDT in fish and breast milk in the same region.

The mean content of organic pollutants in fish from the Bizerte lagoon are low when compared with highly impacted aquatic ecosystems worldwide (Beyer et al., 1996; Kwon, 2006; Blahová, 2010). However, they are similar to those measured in the goby of Venice lagoon (Italy), Belgian North Sea and along the Scheldt Estuary (Belgium) (Voorspoels et al., 2004; Nesto et al., 2007), and in sea bass of Southern Europe (Fernandes et al., 2008).

Somatic parameters or gross indices determined in the current study included CF and HSI, which are useful in assessing the health status of fish and the toxic effects of pollutants. According to Van der Oost et al. (2003), initial screening to identify exposure and effects of pollutants can be achieved, using basic, simple and cost-effective measures of condition. Such measures may be used to assess the ability of animals to tolerate toxic challenges or other environmental stress (Mayer et al., 1992; Whyte et al., 2000). CF, based on the length-weight relationship of a fish has often been used as an indication of the general fitness of a fish (Bolger and Connolly, 1989) as well as to investigate the effects of contaminants (Bervoets and Blust, 2003; Pyle et al., 2005). In this study, no significant difference was found in CF between the five stations, indicating that the fish were generally in good condition. Also, the absence of difference between the stations can be associated to the narrow size range of analysed individuals, intentionally selected in order to avoid size effects on biochemical

responses. HSI is a measure of energetic reserves of the liver and metabolic activity, and has been shown to increase in response to chemical contamination (Slooff et al., 1983). Enlargement of the liver is assumed to result from either an increase in cell size (hypertrophy), or an increase in cell number (hyperplasia) (van der Oost et al., 2003). There was no statistically significant difference in HSI among fish sampled from the five stations. Although pollution can potentially affect CF (Hodson et al., 1992; Pyle et al., 2005) and HSI (Billiard and Khan, 2003; Khan, 2006), none of these methods are sensitive enough to reveal pollutant effects, and are generally more sensitive to other parameters such as habitat and food quality and availability (Lobon-Cervia et al., 1991; Wu et al., 2003).

The concurrent use of several biomarkers is very useful to assess the effects of complex pollutant cocktails. This study uses a multibiomarker approach comprising AChE, EROD, GST and CAT activities and TBARs levels. This approach was able to efficiently detect biological responses in fish from locations with various degrees of pollution.

AChE activity inhibition is generally considered as a biomarker of neurotoxic effects. It has been shown that organophosphorous and carbamates, pesticides widely used in agriculture, are potent inhibitor of AChE (Eto, 1974; Fulton and Key, 2001). Depending on environmental conditions, the contribution of pesticides to the pollution of rivers by surface water runoff may be relevant. This could possibly be the case at the sampling site S2, an area with high levels of agricultural activity (Dellali et al., 2001b). Our results showed that fish caught at this site exhibited the lowest AChE activity (Figure IV.2.3A), indicating possible discharge of insecticides by the Haima River. Another remarkable result was the low AChE activity found in fish from stations S1 and S4, given that these areas receive numerous urban and industrial wastewaters with a great variety of pollutants (Trabelsi et al., 2005; Louiz et al., 2008; Barhoumi et al., 2013a,b). The higher levels of AChE activity at S3 were probably due to the low levels of OCPs accumulated in their tissues (Table IV.2.1), since, our data showed a significant negative correlation between AChE activity and concentrations of HCB and Σ DDTs (Table IV.2.2). Station S5 — chosen in this study as the reference site — is located far from urban and industrial sources of pollution, but remains influenced by agricultural inputs. The low AChE activity at this site could therefore be indicative of a higher level of pesticide contamination at this site (Figure IV.2.2). The absence of published data on AChE measurements on *Z. ophiocephalus* does not allow comparisons. However, comparable AChE values have previously been recorded in other species with a similar lifestyle. For example, Sánchez-Nogué et al. (2013) reported AChE values of $14.7 \pm 0.7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot in}$ *Solea solea* collected from Ebro Delta, and Kopecka-Pilarczyk (2013) reported values of

$32.92 \pm 3.27 - 46.97 \pm 5.12$ and $46.09 \pm 4.39 - 60.66 \pm 5.66$ pmol min⁻¹ mg⁻¹ in flounder from Portugal and Poland, respectively.

The cytochrome P4501A (CYP1A) is of central importance to the metabolism of many xenobiotics. Induction of hepatic mixed-function oxidase enzymes, especially CYP1A and associated ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity, is considered a pertinent indicator of exposure of fish to organic pollutants, such as PAHs, PCBs and other dioxin-like compounds (Whyte et al., 2000). In our study, the fish collected at stations S1 and S2 exhibited higher EROD activity levels, and the tissue content of POPs were highest there compared with other stations (Figure IV.2.2). Our data showed significant positive correlations between EROD activity and Σ POPs (Table IV.2.2). Our data are consistent with the findings of Van der Oost et al. (2003) who reported significant correlations between induction of EROD activity and POPs in fish tissues. As *Z. ophiocephalus* is a resident benthic fish, which lives in close relation to sediment, building its nest by burrowing into it (Malavasi et al., 2002). It is likely that the increased hepatic EROD activity in the stations S1 and S2 is directly related to the high concentration of POPs in the surface sediments of these areas (Mzoughi et al., 2002; Barhoumi et al., 2013a,b). EROD activities ($2.69 \pm 1.27 - 98.23 \pm 12.17$ pmol min⁻¹ mg⁻¹ prot) measured in the present study are in the same range of values determined in *Z. ophiocephalus* collected from the Venice Lagoon (Livingstone and Nasci, 2000., Nesto et al., 2007), although some studies have reported higher levels of EROD activity in this species (Franco et al., 2002).

GST is involved in cellular defense against oxidative stress, and is also a key enzyme of the Phase II detoxification pathway (Habig et al., 1974). Increased GST activity in liver has been demonstrated in various fish species as the result of exposure to PCBs (Otto and Moon, 1996), PAHs (Lu et al., 2009), and pesticides (Peebua et al., 2007). A significant GST induction was observed in fish collected from station S1 compared to fish collected at the reference site (S5) and the remaining stations (Figure IV.2.3C). This likely indicates that fish from station S1 faced high exposure to xenobiotics and reacted by activating multiple defence mechanisms.

CAT is a widely used biomarker of oxidative stress. In literature, elevated hepatic CAT activities were observed in experiments with fish exposed to PCBs- or PAH-containing sediments, but other laboratory studies failed to demonstrate any significant CAT changes (Lionetto et al., 2003; Kopecka and Pempkowiak, 2008). Both induction and inhibition were observed after the exposure of fish to environmental pollution (Van der Oost et al., 2003). In this study, higher CAT activity was observed in fish from station S1 compared with those

from the remaining stations ($P < 0.05$), which might be related to the presence of greater amounts of peroxisome proliferators at this site (Figure IV.2.2).

Lipid peroxidation, which is generally indicated by increasing levels of TBARS, has been used as an effective biomarker of oxidative damage in fish (Livingstone, 2001; Oakes and Van Der Kraak, 2003). Oxidative damage can occur when antioxidant and detoxifying systems are deficient and unable to neutralise the active intermediates produced by xenobiotics and their metabolites (Vasseur and Cossu-Leguille, 2003). A large number of xenobiotics were shown to induce an increased TBARS levels (Zhang and Wang, 2003). In our study, the increase of TBARS content at S1 proved that the lipid peroxidation in fish liver was induced in response to oxidative stress.

The battery of parameters applied in this study included the fishes' oxidative stress (measured in muscle tissues and liver) and POPs (measured in muscle tissues, provided a discrimination of sites after PCA analysis).

The five stations studied exhibited different pollution patterns and levels, ranging from the cleanest station (S5) to the most polluted station (S1). The PCA analysis also confirmed that the fish from S1 were the most at risk, due to high PAH and PCB contamination, leading to increased production of reactive oxygen species, which in turn generated elevated levels of oxidative stress (induction of EROD, GST, CAT and TBARS). Fish biometrics did not reveal any difference between sites, indicating that contaminant exposure in the Bizerte lagoon is not impacting upon the general physical state of the fish.

IV.2.5 Conclusions

This ecotoxicological study conducted on grass goby, *Z. ophiocephalus*, from Bizerte lagoon, showed that PAHs, PCBs and OCPs have accumulated at low to moderate concentrations in individuals throughout the lagoon, but at higher levels in fish collected in the Bizerte canal. However, the combination of biomarkers and tissue contaminant could in many cases detect geographical differences related to the nature and degree of pollution within the study area. A global analysis of grass goby responses indicates that station S1 was more polluted with POPs than the remaining stations. The oxidative stress was confirmed by a significant induction of EROD, GST and CAT activities, and TBARS levels in station S1. Fish biometrics and the condition indices (CF and HSI) were found to be less sensitive biomarkers. The integrated approach combining chemical analyses in tissue and biochemical biomarker responses in the grass goby appears valuable for pollution and stress monitoring in

marine coastal areas along the Mediterranean coast. The present study on the Bizerte lagoon generated a large amount of data that could be very useful as a baseline for future pollution monitoring programs along the continental coasts of Tunisia.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia for its financial support.

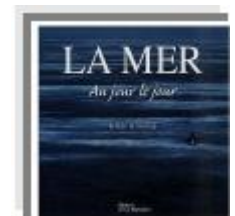
Conclusion

L'analyse globale des réponses biochimiques chez les deux espèces étudiées, le gobie et la moule méditerranéenne indique que les individus de la station S1 située dans le canal de Bizerte sont plus impactés par les polluants organiques persistants que sur les autres stations. La comparaison entre les concentrations mesurées dans les organismes marins de la lagune de Bizerte et celles relevées dans la littérature montre une faible contamination par les polluants organiques persistants.

Chez les moules, la variabilité des réponses biochimiques entre les stations a été associée à une contamination chimique ainsi qu'à une fluctuation des paramètres abiotiques (pH, salinité, température) et physiologiques (indice de condition). Ces résultats suggèrent la nécessité de prendre en compte les facteurs abiotiques et physiologiques lors de la conduite d'une évaluation de la contamination des moules par des contaminants organiques persistants.

Chez les poissons, bien que les données biométriques (facteur de condition, indice hépatosomatique, poids total, longueur totale et poids du foie) apparaissent peu sensibles aux variations des polluants, les biomarqueurs biochimiques ont permis de discriminer les différents sites étudiés.

L'ensemble de ces résultats montre que la moule *M. galloprovincialis* et le poisson gobie *Z. ophiocephalus* peuvent être utilisés en tant qu'espèces bioindicatrices dans le cadre de programmes de surveillance de la pollution marine côtière. L'importance d'utiliser une approche intégrée combinant des analyses chimiques et biochimiques a été démontrée dans le présent travail.



CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les milieux aquatiques naturels subissent une pression anthropique croissante et reçoivent des quantités remarquables de micropolluants organiques et métalliques issus de l'activité humaine, industrielle et agricole. Des suivis environnementaux sont alors nécessaires afin de progresser dans la compréhension des origines et des conséquences de la présence de ces polluants.

La compréhension des processus de transfert de micropolluants dans les réseaux trophiques, leur bioaccumulation dans les organismes, et les effets toxiques directs ou indirects qu'ils peuvent engendrer sur les individus, les populations et les écosystèmes en général apparaît fondamental dans l'évaluation et la gestion des risques posés par les contaminants organiques sur l'environnement et l'homme. Parmi ces polluants, les HAPs, les PCBs, les PBDE, les OCPs et les métaux sont particulièrement redoutés car ils sont très persistants dans l'environnement, se concentrent dans les sédiments et se bioaccumulent dans les tissus riches en lipides et sont bioamplifiés le long des réseaux trophiques. Bien que de nombreuses études toxicologiques aient été faites sur la lagune de Bizerte. Ces travaux ont montré que les connaissances acquises sont fragmentaires et se limitaient généralement sur l'utilisation d'une seule approche telle que le dosage des polluants ou l'étude de biomarqueurs.

L'objectif de cette étude est donc d'établir un bilan de la qualité du milieu lagunaire en utilisant une approche multi-marqueurs regroupant tous les outils nécessaires (Analyses chimiques, bioessais et biomarqueurs) pour la surveillance des milieux et en particulier la lagune de Bizerte.

Les résultats de l'analyse des composés organiques ciblés ont montré que:

- L'extraction par solvant accélérée (ASE) constitue une technique adéquate pour l'extraction des composés recherchés.
- La CPG sur colonne capillaire PTE-5 couplée à un détecteur à capture d'électrons permet la séparation et la détection des OCP, PCB et PBDE ciblés.
- La HPLC sur colonne silice greffée C18 (LC-PAH) couplée à un détecteur fluorimétrique (FP-2020) et la CPG sur colonne capillaire HP5-MS couplée à un détecteur spectrométrie de masse ont permis la séparation et la détection des HAPs recherchés.

L'ensemble de ces techniques a permis de caractériser le niveau de contamination des sédiments de surface et des organismes marins sélectionnés par les composés organiques étudiés.

Afin de fournir un bilan quantitatif de la contamination des sédiments de la lagune de Bizerte par trois familles de contaminants organiques: des polychlorobiphényles (PCB), des pesticides organochlorés (HCB et DDT et ses métabolites) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Des sédiments de surface ont ainsi été prélevés selon une stratégie d'échantillonnage visant à obtenir une bonne couverture spatiale, représentative de la lagune. Les niveaux de contamination, la distribution spatiale, les sources et la toxicité potentielle ont ainsi été déterminés pour chaque famille de contaminants étudiés. Ces données sur la contamination chimique ont été accompagnées par la mesure de paramètres auxiliaires appropriés (carbone organique total, granulométrie, pH et salinité). L'ensemble de ces données a permis d'estimer les concentrations en contaminants accumulés dans les sédiments dans les fractions dites « échangeable » et enfouies.

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que par comparaison avec d'autres régions du monde, les sédiments de surface de la lagune de Bizerte présentent une contamination faible à modérée par les HAP, les PCB et les pesticides organochlorés.

Les niveaux de contamination par les HAP sont compris entre 16.9 à 394.1 ng g⁻¹ poids sec (PS), les concentrations les plus élevées ont été observées au niveau du canal de Bizerte (S1 et S2) indiquant des apports diffus de HAP, principalement issus des activités urbaines et industrielles. Les concentrations les plus faibles ont été enregistrées au niveau de la station S17. Les faibles teneurs enregistrées au niveau de cette station peuvent être expliquées par le fait qu'elle est située à l'extrémité sud-east de la lagune, se trouve à l'abri de tous rejets et elle est soumise aux jeux des marées, ce qui semble perturber le piégeage des HAP par les sédiments au sein de ce milieu très agité. L'étude de certains rapports caractéristiques des HAP permet de conclure à la prédominance de l'origine pyrolytique de la contamination des sédiments. Les sources pétrolières apparaissent comme minoritaires, avec la possible exception de la station S6 où des valeurs inférieures à 1 du rapport Flu/Pyr ont été relevées dans les sédiments de surface. Des corrélations significatives sont également notées entre la somme des HAP et les HAP individuels, indiquant une origine similaire, principalement pyrolytique. D'une manière générale, les HAP sont caractérisés par la prédominance des HAP de hauts poids moléculaires qui représentent plus de 45 % de la somme des HAP. En effet, les HAP de faibles poids moléculaires comme le Nap, Ant, et Phe sont plus volatils et se dégradent plus rapidement que les HAP de hauts poids moléculaires (Fernandes et al., 1997; Macias-Zamora et al., 2002). La toxicité potentielle des HAP présents dans les sédiments a été évaluée grâce à différentes valeurs guides sédimentaires. Les sédiments de la station S1 présentent des niveaux de contamination par les HAP supérieurs au

seuil ERL (effects range low). La contamination de la station S1 représente donc une menace potentielle pour les organismes aquatiques benthiques.

Concernant les PCB, plusieurs congénères ont été identifiés (10 congénères). Les concentrations individuelles sont comprises entre non déterminé (nd) et 3.1 ng g^{-1} PS. Ce sont les congénères les plus chlorés qui dominent dans le compartiment sédimentaire: les congénères hexachlorés (PCB 138 et PCB 153) et heptachlorés (180) représentent plus de 60% de la somme des PCB. L'analyse de la distribution spatiale des PCB a montré que le carbone organique total (COT) exerce une influence plus forte que le pH et la granulométrie des sédiments. Ainsi, on a observé une corrélation positive relativement élevée ($r = 0,86$) entre le COT et la somme des PCB. Contrairement aux HAP, dont les sources sont multiples, la contamination par les PCB est plus locale et plus confinée. Il semble que pour cette famille de contaminants la source principale provient de centaines d'unités industrielles et de décharges installées autour de la lagune.

L'étude de la contamination des sédiments de la lagune de Bizerte par les pesticides organochlorés met en évidence la prédominance du DDT et de ses métabolites avec une concentration allant jusqu'à 11.5 ng g^{-1} PS au niveau de la station S1 du canal de Bizerte. Le HCB a été également détecté, mais avec une distribution homogène pour toutes les stations. En effet, son utilisation agricole, notamment pour l'enrobage des semences et la préservation du bois ainsi que sa formation lors de nombreux processus de synthèse des solvants chlorés (le tétrachlorure de carbone par exemple), en font l'un des OC les plus répandus dans l'environnement (Courtney, 1979). Les niveaux les plus élevés en DDT et ses métabolites, ont été observés près des berges, indiquent vraisemblablement des apports issus du lessivage du bassin versant. La distribution géographique des OCP dans la lagune est relativement bien corrélée avec celle du carbone organique total. Les sédiments des stations S1 et S3 présentent des niveaux de contamination par les DDT supérieurs au seuil ERM (effects range-median) et PEL (probable effect level). Ces deux stations sont donc susceptibles de présenter un risque important pour la faune benthique.

L'ensemble de ces résultats ont montré que les sédiments de la lagune de Bizerte peuvent exercer un effet néfaste sur les organismes aquatiques qui résident dans cet écosystème. Cependant, l'estimation de niveaux de contamination par les POPs ne peut, à elle seule, prédire les effets biologiques des mélanges de contaminants (synergies...) ni quantifier la biodisponibilité des polluants pour les organismes vivants. Il existe donc un besoin urgent d'utiliser plus largement les bioessais (tests biologiques), qui peuvent apporter des informations complémentaires sur la contamination de la lagune et les conséquences

potentielles sur l'état de santé des populations aquacoles. Ainsi, nous avons évalué la toxicité potentielle de sédiments de cinq stations de la lagune de Bizerte par une batterie de bioessais. La sélection de cinq stations parmi 18 est basée sur les différents niveaux de concentration mesurés pour les POPs. Par ailleurs, il a été largement démontré que les métaux peuvent être toxiques pour les faunes benthiques. De ce fait, et en plus des POPs mesurés, 8 métaux ont été dosés dans les 5 stations pour aider à l'interprétation de la toxicité observée.

Afin de maximiser la sensibilité, le potentiel de discrimination, et la pertinence écologique, le choix a été fait d'utiliser plusieurs bioessais sur différentes phases (élutriat, extrait organique et sédiment entier), avec des marqueurs de toxicité aigüe ou subaigüe. La toxicité des sédiments de la lagune de Bizerte a été observée sur les 3 phases analysées. En effet, avec le test embryo-larvaire médaka en sédiment contact, nous avons pu évaluer le danger que représentent les sédiments pour certains organismes benthiques. Ainsi, après exposition aux sédiments provenant de cinq stations de la lagune de Bizerte, les malformations suivantes ont été observées: des œdèmes, des déformations du squelette axiale, des malformations cranio-faciales, des anomalies cardio-vasculaires et des anomalies oculaires. Les élutriats des stations S1, S3 et S4, ce sont également révélés toxiques ce qui peut laisser supposer une toxicité des xénobiotiques sédimentaires relargués dans l'eau lors de la remise en suspension des sédiments. Cependant, aucune corrélation significative n'a été observée entre les concentrations des différents contaminants mesurés et la toxicité potentielle observée. Ceci peut s'expliquer par les raisons suivantes: tout d'abord, dans des environnements pollués les sédiments peuvent être contaminés par des centaines de composés différents y compris des produits de dégradation, seul un nombre limité de contaminants a été recherché dans la présente étude. En outre, les interactions entre les contaminants peuvent entraîner des effets antagonistes ou synergiques qui peuvent masquer une telle corrélation. Des tests *in vitro* (SOS Chromotest[®]) ont également été réalisés sur des extraits organiques de sédiments. Un potentiel génotoxique a pu être mesuré pour l'extrait organique de sédiment de la station S1. Cette génotoxicité n'apparaît qu'après bioactivation par des extraits enzymatiques hépatiques (fraction microsomale S9) et résulte donc vraisemblablement de la présence de composés organiques pro-génotoxiques associés aux matières particulières.

Les résultats des analyses chimiques ont montré que les sédiments de surface des 18 stations de la lagune de Bizerte sont plus ou moins contaminés par les POPs. Or, certains organismes marins tels que les mollusques bivalves notamment, peuvent bioconcentrer ces polluants. Il est donc nécessaire d'évaluer les risques que présentent ces apports pour la faune de la lagune. Pour cela, deux espèces représentatives de cette lagune, la moule *M.*

galloprovincialis et le poisson gobie *Z. ophiocephalus* ont été prélevés sur différents sites de la lagune et ont servi pour l'étude de la bioaccumulation des POPs et de ses effets. D'après Olesen et Weeks (1994), un bon programme de biomonitoring devrait faire appel à autant d'espèces que possible en fonction du budget disponible. En effet, l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques au moyen d'une seule espèce sentinelle s'avère être une démarche relativement restrictive du fait de la complexité du milieu et de la fluctuation spatio-temporelle des paramètres biotiques et physico-chimiques. Par exemple, le poisson est un excellent organisme sentinelle, mais sa mobilité plus au moins grande selon les espèces, peut empêcher de localiser avec précision de la source d'une pollution éventuellement détectée. Donc dans le présent travail la sélection de deux espèces différentes (vertébrés et invertébrés) l'une fixée et l'autre relativement sédentaire et territoriale est un bon choix pour la biomonitoring de la lagune de Bizerte.

Les teneurs des POPs enregistrées dans les échantillons des poissons (muscles) et des moules (tissus mous) analysés démontrent une contamination générale des organismes étudiés par les OCP, les PCB, les PBDE et les HAP. Ainsi, le HCB a été détecté dans tous les échantillons analysés à des concentrations moyennes de 0,4 et de 0,6 ng g⁻¹ PS respectivement dans les poissons et les moules. Le Lindane, cis-chlordane, trans-chlordane et le Mirex sont inférieurs à la limite de détection dans les tissus des deux espèces. Le DDT et ses métabolites (DDD et DDE) ont été mesurés à des concentrations moyennes de 34,5 et de 23,4 ng g⁻¹ PS respectivement dans les poissons et les moules. Ces composés représentent 97 % de la teneur moyenne des OCP analysés dans les échantillons des poissons et des moules. L'abondance des résidus de DDT peut résulter des processus de métabolisme ou biodégradation subit par ces substances, en effet le DDT a une durée de rémanence plus élevée par rapport aux autres composés, ce qui le rend difficilement biodégradable. Par ailleurs, sa prédominance pourrait être expliquée par une éventuelle utilisation intensive dans le domaine de l'agriculture. L'analyse chromatographique fait ressortir une contamination marquée par les PCB avec une prédominance des congénères fortement substitués tels que les PCB-138 et 153. Ces deux composés représentent 38,3% et 51,9% de la somme des congénères de PCB analysés respectivement dans les poissons et les moules. En raison de leur coefficient de partage octanol-eau (Kow) élevés et de la position de leurs atomes de chlore, ces congénères sont peu métabolisables et par conséquent bioaccumulables dans les organismes marins. Les valeurs des concentrations des PCB étudiés dans les échantillons des poissons et des moules sont faibles par rapport à celles rapportées par certains travaux de la littérature. Chez les moules, parmi les quatre congénères de PBDE étudiés seul le BDE-47 a été détecté dans tous les

échantillons. La prédominance du BDE-47 dans la présente étude est en accord avec les résultats rapportés dans les bivalves d'autres régions du monde: La rivière Niagara, Canada (Richman et al., 2013); la mer Bo, Chine (Wang et al., 2009); le lac Maggiore, Italie (Binelli et al., 2008) et la côte de Corée (Moon et al., 2007). Le PBDE 47 est très présent dans les différents compartiments environnementaux et constitue souvent le PBDE majoritaire (entre 50 et 90 %) (De Wit, 2002). Paradoxalement, ce composé est un des PBDE les moins produits et les moins utilisés. Les composés tétraBDE constituent moins de 3 % de la production mondiale en PBDE. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce paradoxe, l'existence de sources secondaires telles que la débromation des PBDE plus lourds (Hua et al., 2003), la très faible capacité de dépuración de ce composé par les organismes ou sa capacité de bioaccumulation et de bioamplification importante prouvée par plusieurs auteurs (Burreau et al., 2004; Stapelton et al., 2004; Tapie, 2006). Les teneurs moyennes en HAP totaux dans les tissus mous des moules sauvages et dans les muscles des poissons sont de l'ordre de 169.3 et 55.2 ng g⁻¹ PS respectivement. Ces résultats sont bien attendus puisque les moules bioaccumulent fortement les HAP tandis que les poissons les métabolisent. Les empreintes moléculaires des tissus des moules et des poissons sont caractérisées par la présence majoritaire des composés de faibles poids moléculaire (2 à 4 cycles). Ils représentent 29,7% et 92,1% de la somme des HAP analysés respectivement dans les échantillons de poisson et de moule. Les composés de hauts poids moléculaire sont relativement peu présents (poissons) ou absents (moules) dans les tissus des espèces étudiées. L'accumulation préférentielle des HAP de faibles poids moléculaire est déterminée par leur solubilité et la leur biodisponibilité, lié au coefficient de partage octanol-eau (Kow), leur poids moléculaire, la voie d'exposition et l'ingestion des HAP (Conell et Miller, 1984).

Les niveaux de contamination sont dépendants de la station étudiée, c'est-à-dire des sources de contamination. Parmi les stations choisies, les stations S1 et S3 apparaissent systématiquement comme les zones les plus polluées. Ainsi les concentrations des POPs dans les deux espèces étudiées ont été plus élevées dans ces deux stations. La faible contamination observée sur les autres stations, peut être due à l'absence de sources anthropiques majeures de contamination par les POPs.

Les niveaux de contamination sont dépendants aussi de l'espèce. Quel que soit le site d'échantillonnage, les concentrations des différents POPs étudiés sont plus élevées dans le moule que dans le poisson. Les différences de concentrations des polluants étudiés entre les deux espèces sont probablement liées à leurs différences de régime alimentaire, de capacité métabolique et de position trophique dans la chaîne alimentaire. Divers travaux ont montré

une certaine structure-dépendance de la bioaccumulation d'une molécule organique en fonction du niveau trophique de l'espèce (Looser et al., 1998; Perez-Ruzafa et al., 2000). Dans le présent travail, bien que les moules occupent une position plus bas dans la chaîne alimentaire que les poissons, ils sont connus par leur capacité à concentrer les polluants organiques à partir de l'eau et des matières en suspension (Edgar et al., 2006; Doerr et Liebezeit, 2009). En effet, contrairement aux poissons les bivalves montrent une capacité très limitée de métaboliser les PCB et les HAP par le système du cytochrome P450 (Cajaraville et al., 2000), et par conséquent, les concentrations de chacun de ces composés sont plus élevés dans les moules que dans les poissons. Les HAP sont connus comme étant des molécules métabolisables (Mazéas, 2004). Ils sont constitués de cycles aromatiques non substitués, de conformation plane. Cette conformation permet une interaction forte avec les enzymes de métabolisation. Les enzymes mono-oxygénases à cytochrome P-450 intervenant lors de la phase I de métabolisation les transforment principalement en diols, phénols et des quinones (Mazéas, 2004). Il est admis que les micropolluants organiques lipophiles ne présentent pas le même niveau de métabolisation ou de stockage dans les divers tissus. De plus, leurs taux d'imprégnation et de bioaccumulation sont dépendants de la charge lipidique des tissus (Walker et Livingstone, 1992; Livingstone et al., 1995). Ainsi, dans le présent travail, les tissus mous des moules qui sont chargés en lipide (de 13.7 à 20.9%) montrent des concentrations élevées en POPs. A l'opposé, les muscles des poissons qui sont pauvres en lipides (de 3.7 à 5.1%) sont peu chargés en POPs. Il est donc naturel d'observer des profils d'imprégnation très différents selon les tissus.

La mesure des concentrations de ces différents contaminants chimiques dans les organismes peut renseigner sur la biodisponibilité des contaminants présents dans l'environnement en permettant de qualifier et quantifier les substances. Ils représentent ainsi des preuves évidentes d'exposition. Cependant, ils ne représentent pas systématiquement de bons indicateurs des niveaux d'exposition du fait de l'existence de processus biologiques intervenant dans leur détoxification et excrétion. Leurs mesures, à elles seules, ne donnent pas accès aux informations sur les effets biologiques induits.

Afin d'évaluer l'impact écotoxicologique des polluants sur les organismes marins, l'utilisation des marqueurs biologiques ou biomarqueurs est de plus en plus recommandé notamment par l'OSPAR en Atlantique ou le CIEM en Méditerranée. Ces biomarqueurs ont été largement utilisés dans le cadre des programmes de surveillance de la qualité de l'environnement en raison de leur capacité à fournir des informations sur les niveaux d'exposition (marqueurs d'exposition) ou l'état de santé des individus (marqueurs d'effets).

Néanmoins, ces réponses biologiques ne peuvent être révélées en utilisant un biomarqueur unique. L'utilisation *in situ* de batteries de biomarqueurs permet vraisemblablement une évaluation réaliste et fiable des effets écotoxicologiques des polluants sur les écosystèmes (Lagadic et al. 1997). Cependant, la mise en œuvre de cette approche par biomarqueurs nécessite l'utilisation d'organismes bioindicateurs. Les bivalves et les poissons sont considérés comme d'excellents indicateurs de contamination en raison de leur forte capacité de bioaccumulation des polluants (voir chapitre I). Ce qui reflète, contrairement aux analyses réalisées sur le sédiment, la quantité de polluants biodisponibles dans l'environnement. De ce fait, les bivalves ont été utilisés dans les programmes de biosurveillance de la qualité de l'environnement. Les moules *M. galloprovincialis* ont été utilisées dans les programmes « Mussel Watch » aux Etats-Unis ou « RNO » en France. De même, le poisson gobie *Z. ophiocephalus* a été proposé comme un bon bioindicateur de pollution (Louis, 2010). Dans la présente étude une approche multi-paramétrique a été mise en place en utilisant plus d'un biomarqueur pour l'évaluation diagnostic et prédictive des effets de la pollution sur les organismes sélectionnés. Les biomarqueurs utilisés sont l'acide thiobarbiturique (TBARS), le glutathion-S-transférase (GST), la catalase (CAT), l'Ethoxyrésorufine O-dééthylase (EROD) et l'acétylcholinestérase (AChE).

Les résultats de l'analyse des biomarqueurs chez les poissons ont montré que l'inhibition de l'activité AChE dans la plupart de stations étudiées est probablement liée à l'existence de nombreux rejet d'origine urbaine et industrielle qui renferment une quantité considérable de pesticides et de métaux. Ainsi, nos données ont montré une corrélation négative significative entre l'activité AChE et les concentrations de HCB et ΣDDTs. L'induction de l'activité EROD, CAT, GST et TBARS au niveau de la station S1 indique probablement que les poissons de cette station font face à une forte exposition aux xénobiotiques qui se traduit par une activation de mécanismes de défense multiples. Cette induction est confirmée par une corrélation positive significative entre les niveaux des différents biomarqueurs mesurés et la teneur des POPs mesurés au niveau des muscles.

La situation de stress oxydatif observé chez les poissons a été aussi confirmé chez les moules. Ainsi une induction de l'activité GST et une inhibition de l'activité AChE ont été mesurées au niveau des branchies. Parallèlement les activités GST et AChE sont respectivement corrélées positivement et négativement avec la ΣDDT.

A côté des POPs, plusieurs études ont documenté l'influence de divers facteurs biotiques (indice de condition, facteur de condition et indice hépato-somatique) et abiotiques (pH, salinité et température) sur les réponses des biomarqueurs (Eggleton and Thomas, 2004). De

ce fait, l'estimation de la variabilité naturelle des biomarqueurs apparaît indispensable avant de les prendre en considération dans les programmes de surveillance.

Il a été démontré ici que les facteurs biotiques ou physiologiques n'ont aucun effet sur les réponses des biomarqueurs étudiés. L'absence de variations des facteurs biotiques entre les sites étudiés est très probablement due à la gamme de taille étroite des individus analysés, intentionnellement sélectionnée afin d'éviter les effets de taille sur les réponses biochimiques. Seuls les poissons femelles ont été choisis afin de limiter la variabilité biologique due au sexe. Egalement, pour une même période de prélèvement sur tous les sites il n'y a pas de différences au niveau des paramètres physico-chimiques.

Chez les moules, contrairement aux poissons, il a été démontré que les facteurs abiotiques ont une influence sur les concentrations en POPs et les réponses des biomarqueurs. En effet, les branchies des moules qui ont été utilisées pour le dosage des biomarqueurs sont en contact direct avec de l'eau et les sédiments ce qui les rend plus sensibles aux variations des paramètres environnementaux et plus sujettes au stress oxydatif que les autres tissus (Regoli et Principato, 1995).

Enfin, la batterie des paramètres appliqués dans le présent travail, y compris les paramètres chimiques, biotiques, abiotiques et biochimiques, ont fourni une discrimination des stations étudiées avec différents niveaux de contamination après analyses en composantes principales (ACP). Chez les moules la station S3 paraît comme la station la plus polluée, tandis que les stations S2 et S5 sont moins polluées. Ces résultats sont en accord avec les résultats rapportés par Dellali et al. (2001b) dans la même lagune. Ils ont montré une contamination de la station S3 à travers l'analyse de l'activité AChE dans les moules. De même Dellali et al. (2001a) et Khessiba et al. (2001) ont montré une faible contamination de la station S2 à travers l'analyse de l'activité CAT. Chez les poissons, la combinaison des analyses chimiques et biochimiques ont fourni une discrimination des stations étudiées allant de la station la plus propre (S5) à la station la plus polluée (S1). L'ensemble des résultats obtenus confirment ainsi l'intérêt d'une approche multi-paramétrique pour discriminer les sites d'étude afin d'établir un diagnostic reposant sur la réponse des organismes à la pollution.

L'approche utilisée lors de notre étude permet un diagnostic environnemental accessible à tous les pays permettant le suivi et la conservation des milieux marins côtiers à l'échelle nationale et internationale. Elle peut être utilisée par les organismes en charge de la surveillance de la qualité et de la préservation du milieu marin. En plus, de tels indicateurs biologiques peuvent servir à la détection de signes précurseurs d'éventuels problèmes environnementaux, à identifier les causes et les effets entre les perturbations du milieu et les

répercussions sur le plan biologique ainsi qu'à l'évaluation de l'efficacité des mesures mises en oeuvre pour préserver ou restaurer la qualité des milieux naturels (Kaiser, 2001). Ce type d'approche de biosurveillance faisant appel aux indicateurs biologiques a l'avantage d'être peu coûteux comparativement aux méthodes traditionnelles ou conventionnelles qui se limitent uniquement à des mesures physico-chimiques ou de polluants

Aussi, un autre aspect important de l'utilisation des espèces sentinelles comme la moule et le gobie réside dans le fait qu'ils renseignent sur l'exposition réelle du biote à l'ensemble des différents contaminants présents et ceci de façon intégrée dans le temps contrairement aux mesures instrumentales dans le milieu qui ne peuvent offrir qu'une image ponctuelle et statique de la situation (Fränzle, 2003).

A l'issue de ce travail et au vu des résultats obtenus, *Mytilus galloprovincialis* et *Zosterisessor ophiocephalus* pourraient constituer des organismes sentinelles tout à fait satisfaisant dans le cadre d'une approche multibiomarqueurs pour la surveillance de la pollution en milieu lagunaire.

En conclusion, nous considérons qu'un couplage des tests biologiques (bioessais) aux analyses chimiques et biologiques *in situ* dans une perspective d'évaluation et de gestion des risques associés à la pollution des milieux et plus particulièrement du compartiment sédimentaire est indispensable. En effet, la combinaison de ces outils garantit une meilleure évaluation de l'exposition et des effets indésirables associés aux contaminants sédimentaires à l'égard des communautés benthiques. L'application d'une telle triade pourra alors favoriser des prises de décision éclairées qui contribueront à la protection et à la conservation des écosystèmes aquatiques.

Les principaux apports originaux de cette thèse se récapitulent dans les points suivants:

- ❖ L'évaluation de la toxicité potentielle des sédiments, à l'aide des valeurs guides sédimentaires et une batterie de bioessais;
- ❖ L'étude de la répartition spatiale des POPs dans la lagune de Bizerte soumise à de nombreuses sources de pollution et l'évaluation de l'impact écotoxicologique de cette contamination sur des organismes bioindicateurs (approche multi-espèces).

Les résultats de cette thèse offrent de nombreuses perspectives:

- Pour les HAP dans les sédiments, nous avons pu évaluer les sources de contamination pyrolytiques et pétrogéniques grâce à différents indicateurs aromatiques. L'étude de

certain marqueurs tels que les hopanes ou les acides gras permettrait d'apporter des informations plus précises ou complémentaires sur l'origine de la contamination.

- Dans la présente étude, les tests Microtox[®] et SOS Chromotest[®] ont été réalisés sur des extraits organiques bruts sans purification, cette étape ne permet pas seule d'identifier la ou les classe des contaminants responsable de la toxicité observée. Ceci nécessite la purification des extraits bruts afin de comprendre clairement quelle est la catégorie de polluants qui a causé la toxicité (l'approche TIE : Toxicity Identification Evaluation).
- Les bioessais en laboratoire ne peuvent donner qu'une mesure approximative de la toxicité d'un milieu, car ils ne permettent pas de simuler parfaitement les conditions du milieu naturel (température, salinité, lumière, turbidité, oxygène) qui modifient la spéciation, la biodisponibilité et la toxicité des contaminants. En plus des modifications physico-chimiques des échantillons lors de leur prélèvement, stockage et manipulation peuvent avoir lieu. Ces résultats ouvrent des perspectives à plus long terme, vers l'évaluation de la toxicité des sédiments *in situ* par l'encagement d'organismes benthiques par exemple.
- Cette étude ne prend en considération qu'un nombre limité d'effets notamment la métabolisation des xénobiotiques et le stress oxydant. Nous envisageons d'accroître le nombre de biomarqueurs dans la batterie afin d'en augmenter le spectre d'effets mesurés. À titre d'exemple, on peut indiquer les biomarqueurs de perturbation endocrinienne (*e.g.* vitellogénine, cytochrome P450 aromatisation), les biomarqueurs histopathologiques (étudier l'impact de la pollution sur l'appareil reproducteur, le foie, les branchies...) et les biomarqueurs de génotoxicité (*e.g.* test des comètes, test des micronoyaux).
- Le milieu naturel est éminemment complexe et peut receler un grand nombre de contaminants pouvant interagir entre eux selon des actions synergiques, antagonistes ou additives (Seed et al., 1995). Il est donc indispensable d'étudier au préalable les effets individuels de contaminants modèles ou appartenant aux familles les plus fréquemment rencontrées dans les systèmes aquatiques. De telles études s'effectuent tout d'abord en laboratoire en conditions contrôlées. En effet, la réalisation d'études sous conditions contrôlées pourrait permettre une meilleure compréhension des interactions biomarqueurs-contaminants et de leur prise en compte dans l'interprétation des résultats obtenus *in situ*.
- Plusieurs études sont également nécessaires pour valider l'utilisation de biomarqueurs biochimiques comme biomarqueurs de pollution. En effet, le principal handicap à

l'utilisation des biomarqueurs dans le milieu naturel demeure l'interférence avec d'autres facteurs de l'environnement (Amiard et al., 1998). Afin d'interpréter au mieux leurs réponses après exposition à un ou plusieurs contaminant(s), il est donc essentiel de connaître leur variabilité naturelle en fonction de la saison et de divers facteurs biotiques et abiotiques.

- Une autre des perspectives de ce travail serait d'étudier les métabolites des HAP, des PCB et des PBDE. Ces métabolites sont majoritairement responsables de la toxicité des HAP, des PCB et des PBDE et ils sont potentiellement bioaccumulables. La compréhension des mécanismes de métabolisation est nécessaire pour mieux appréhender le devenir de ces contaminants.
- Il faudrait également appréhender l'impact de cette contamination sur les organismes à l'échelle individuelle et éventuellement à l'échelle de la population. Ce type d'étude n'est envisageable qu'à travers une approche pluridisciplinaire couplant la chimie, la biologie et l'écologie à travers des allers-retours: expérimentations en milieu contrôlé et études en milieu naturel.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Abarnou, A., Burgeot, T., Chevreuil, M., Leboulenger, F., Loizeau, V., Madoulet-Jaouen, A., Teil, M.J., 2000.** Les contaminants organiques: quels risques pour le monde vivant? Programme Scientifique Seine-Aval, fasc. 13, 35 p.
- Aboul-Kassim, T., Simoneit, B., 1995.** Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Particulate Fallout of Alexandria, Egypt: Sources and Implications. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2473–2484.
- Ach-Ben Fadhel, S., 1995.** Les muges de la lagune de Ghar El Melh: biologie et pêche. DEA, Univ. Tunis, 150 p.
- Adams, S.M., 2002.** Biological indicators of aquatic ecosystem stress: introduction and overview, in: Adams, S.M., (Ed.), *Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress*. American Fisheries Society, Bethesda, MD, pp 1–11.
- ADEME, 1995.** Fiche n°4, conention Ademe /IRH environnement, contrat n° 2750008.
- Ahlborg, U.G., Becking, G.C., Birnbaum, L.S., Brouwer, A., Berks, H.J.G.M., Feely, M., Golor, G., Hanberg, A., Larsen, J.C., Liem, A.K.D., Safe, S.H., Schlatter, C., Waern, F., Younes, M., Yrjanheikki, E., 1994.** Toxic equivalent factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere* 28, 1049–1067.
- Ahlf, W., 1995.** Biotests an Sedimenten. In: Steinberg, C., Bernhardt, H., Klappner, H., (Eds.), *Handbuch Angewandte Limnologie–Teil Aquatische Okotoxikologie*. Landsberg/Ecomed. pp 1–43.
- Ahlf, W., Hollert, H., Neumann-Hensel, H., Ricking, M., 2002.** A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality: A German approach based on ecotoxicological and chemical measurements. *J. Soil Sediment* 2, 37–42.
- Ahl, W., Fôrstner, U., 1988.** Toxicant screening in soil using bioassays. Dans: Wolf, K., van den Brink, W.J., Colon, F.J., (Eds.), *Contaminated Soil'88*. Hamburg, Germany, Kluwer Academic Publishers, pp 459–466.
- Ahn, M.Y., Filley, T.R., Jafvert, C.T., Nies, L., Hua, I., Bezares-Cruz, J., 2006.** Photodegradation of decabromodiphenyl ether adsorbed onto clay minerals, metal oxides, and sediment. *Environ. Sci. Technol.* 40, 215–220.

- Aislabie, J.M., Richards, N.K., Boul, H.L., 1997.** Microbial degradation of DDT and its residues a review. *New Zeal. J. Agric. Res.* 40, 269–282.
- Aïssa, P., 1991.** Ecologie des nématodes libres de la lagune de Bizerte: écologie et biocénétique. Thèse de Doctorat, University de Tunis, Tunisie.
- Alavanja, M.C., Hoppin, J.A., Kamel, F., 2004.** Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public. Health.* 25, 155–197.
- Alebic-Juretic, A., 2011.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments from the Rijeka Bay area, Northern Adriatic, Croatia, 1998–2006. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 863–869.
- Al Khateeb, W., Al-Qwasemeh, H., 2013.** Cadmium, copper and zinc toxicity effects on growth, proline content and genetic stability of *Solanum nigrum* L., a crop wild relative for tomato; comparative study. *Physiol. Mol. Biol. Plant.* (Article in Press).
- AMAP, 1998.** AMAP assessment report: Arctic pollution issues. Arctic monitoring and assessment programme (AMAP), Oslo, Norway. 859, ISBN 82-7655-061-4.
- AMAP, 2000.** PCB in the Russian Federation: inventory and proposals for priority remedial actions. Moscow. (Consulté le 15 févr. 2012). Disponible en ligne: amap.no/documents.
- Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E., 1975.** Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347–364.
- Amiard, J.-C., Caquet, T., Lagadic, L., 1998.** Les biomarqueurs parmi les méthodes D'évaluation de la qualité de l'environnement. In *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, edited by Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., (Paris: Lavoisier, Technique et Documentation), pp XXI-XXXI.
- Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., 2009.** Environmental Assessment of Estuaries Ecosystems. A Case Study. CRC Press, Boca Raton, Etats-Unis.
- Andersson, J.T., Schrader, W., 1999.** A method for measuring octanol-water partition coefficients. *Anal. Chem.* 71, 3610–3614.
- ANPE, 1990.** Étude préliminaire de l'écologie du lac de Bizerte. Rapport, Agence Nationale de Protection de l'Environnement, Tunisie, 100 p.
- Antkiewicz, D.S., Burns, C.G., Carney, S.A., Peterson, R.E., Heideman, W., 2005.** Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish. *Toxicol. Sci.* 84, 368–377.
- APEK, 2005.** Tunisia Country Situation Report Association for Environmental Protection in Kerkennah, Tunisia. <http://www.ipen.org>.

- API, 2002.** Base de données « API », Cadastre des activités industrielles dans le gouvernorat de Bizerte.
- Arbeli, Z., Fuentes, C.L., 2007.** "Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension." *Crop. Prot.* 26, 1733–1746.
- Arias, A.H., Vazquez-Botello, A., Tombesi, N., Ponce-Vélez, G., Freije, H., Marcovecchio, J., 2010.** Presence, distribution, and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments from Bahía Blanca estuary, Argentina. *Environ. Monit. Assess.* 160, 301–314.
- Armitage, P.D., Moss, P., Wright, J.F., Furse, M.T., 1983.** The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. *Water Res.* 17, 333–347.
- ASTM, 1992.** Standard guide for Conducting 10-Day Static Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Amphipods. E-1367-92. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.
- ASTM, 1994a.** Standard guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Polychaetous Annelids. E-1611-94. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.
- ASTM, 1994b.** Standard guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs. E-724-94. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.
- ATSDR, 1995.** Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, Georgia.
- ATSDR, 1996.** Toxicological profile for endrin, 89 p.
- ATSDR, 2002a.** Toxicological profile for hexachlorobenzene, 403 p.
- ATSDR, 2002b.** Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD, 497 p.
- ATSDR, 2002c.** Toxicological profile for aldrin/dieldrin, 354 p.
- Azouz, A., 1974.** Les fonds chalutables de la région nord de la Tunisie. 2- potentialités de la pêche, écologie et répartition bathymétrique des poissons. *Bull. Inst. Océanogr. Pêche Salammbô*, 3, 29–83.
- AZUR Environmental, 1998.** Microtox basic solid-phase test (Basic SPT). Carlsbad, CA, USA.



- Babín, M., Casado, S., Chana, A., Herradón, B., Segner, H., Tarazona, J.V., Navas, J.M., 2005.** Cytochrome P4501A induction caused by the imidazole derivative Prochloraz in a rainbow trout cell line. *Toxicol. in Vitro* 19, 899–902.
- Bach, J., Snegaroff, J., 1989.** Effects of the fungicide prochloraz on xenobiotic metabolism in rainbow trout: In vivo induction. *Xenobiotica* 19, 1–9.
- Bader, M., 1980.** A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. *J. Chem. Educ.* 57, 703–706.
- Baker, J.E., Eisenreich, S.J., Eadie, B. J., 1991.** Sediment trap fluxes and benthic recycling of organic carbon, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyl congeners in Lake Superior. *Environ. Sci. Technol.* 18, 838–849.
- Ballschmitter, K., Zell, M., 1980.** Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. Composition of technical Aroclor and Clophen PCB mixtures. *Fresen. Z. Anal. Chem.* 302, 20–31.
- Barakat, A.O., Kim, M., Qian, Y., Wade, T.L., 2002.** Organochlorine pesticides and PCBs residues in sediments of Alexandria Harbour, Egypt. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 1421–1434.
- Barbieri, O., Ognio, E., Rossi, O., 1986.** Embryotoxicity of benzo(a)pyrene and some of its synthetic derivatives in swiss mice. *Cancer Res.* 46, 94–98.
- Barhoumi, B., LeMenach, K., Dévier, M-H., Ameer, W.B., Etcheber, H., Budzinski, H., Cachot, J., Driss, M.R., 2013.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia: levels, sources and toxicological significance. *Environ. Monit. Assess.* 186, 2653–2669.
- Barhoumi, B., LeMenach, K., Dévier, M-H., El megdiche, Y., Hammami, B., Ameer, W.B., Hassine, S.B., Cachot, J., Budzinski, H., Driss, M.R., 2013.** Distribution and ecological risk of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in surface sediments from the Bizerte lagoon, Tunisia. (Article in Press).
- Barjhoux, I., Baudrimont, M., Morin, B., Landi, L., Gonzalez, P., Cachot, J., 2012.** Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 272–282.

- Barra, R., Notarianni, V., Gentili, G., 2001.** Biochemical biomarker responses and chlorinated compounds in the fish *Leuciscus cephalus* along a contaminant gradient in a polluted river. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 582–590.
- Barra, R., Quiroz, R., Saez, K., Araneda, A., Urrutia, R., Popp, P., 2009.** Sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of the Biobio River in south central Chile. *Environ. Chem. Lett.* 7, 133–139.
- Bauchot, M.-L., 1987.** Les vertébrés. In *Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et Mer Noire*. Fischer, W., Schneider, M., Bauchot, M.-L., (Réd.). (Révision 1), vol. II, 761–1529.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1997.** Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels. *Fresenius J. Anal. Chem.* 359, 502–509.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1998a.** PAHs in Arcachon Bay, France: origin and biomonitoring with caged organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 577–586.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1998b.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean Sea. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 765–776.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Dizer, H., Hansen, P.D., 1999.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Mar. Environ. Res.* 47, 17–47.
- Bayne, B.L., 1989.** Measuring the biological effects of pollution: the mussel watch approach. *Water Sci. Technol.* 21, 1089–1100.
- Bayne, B.L., 2004.** Phenotypic flexibility and physiological tradeoffs in the feeding and growth of marine bivalve molluscs. *Integr. Comp. Biol.* 44, 425–432.
- Bayne, B.L., Bayne, C.J., Carefoot, T.C., Thompson, R.J., 1976.** The physiological ecology of *Mytilus californianus* Conrad - 1. Metabolism and energy balance. *Oecologia* 22, 211–228.
- Bayona, J.M., Albaiges, J., Solanas, A.M., Pares, R., Garrigues, P., Ewald, M., 1986.** Selective aerobic degradation of methyl-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by pure microbial cultures. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 23, 289–303.

- Becker, D.S., Bilyard, G.R., Ginn, T.C., 1990.** Comparaison between sediment bioassays and alterations of benthic macroinvertebrate assemblage at a marine Superfund site: Commencement Bay, Washington. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 669–685.
- Beegle, L.W., Wdowiak, T.J., Harrisor., 2001.** Hydrogenation of polycyclic aromatic hydrocarbons as a factor affecting the cosmic 6.2 micron emission band. *Spectrochim. Acta Pt. A Mol. Biomol. Spectr.* 57, 737–744.
- Beji, O., 2000.** Les ressources vivantes exportables du lac de Bizerte: Etat actuel et potentialités (première partie). *Bull. Inst. Nat. Sci. Tech. Mer Salammbô* 27, 45–60.
- Belfroid, A.C., Sijm, D.T.H.M., Van Gestel, C.A.M., 1996.** Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. *Environ. Rev.* 4, 276–99.
- Benaduce, A.P.S., Kochhann, D., Flores, E.M.M., Dressler, V.L., Baldisserotto, B., 2008.** Toxicity of cadmium for silver catfish *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) embryos and larvae at different alkalinities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 274–282.
- Ben Ameer, W., Ben Hassine, S., Eljarrat, E., El Megdiche, Y., Trabelsi, S., Hammami, B., Barceló, D., Driss, M.R., 2011.** Polybrominated diphenyl ethers and their methoxylated analogs in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Mar. Environ. Res.* 72, 258–264.
- Ben Ameer, W., De Lapuente, J., El Megdiche, Y., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D., Gonzalez-Linares, J., Driss, M.R., Borràs, M., 2012.** Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 241–251.
- Ben Ameer, W., El Megdiche, Y., Eljarrat, E., Ben Hassine, S., Badreddine, B., Trabelsi, S., Hammami, B., Barceló, D., Driss, M.R., 2013a.** Organochlorine and organobromine compounds in a benthic fish (*Solea solea*) from Bizerte Lagoon (northern Tunisia): Implications for human exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 88, 55–64.
- Ben Ameer, W., Trabelsi, S., Driss, M.R., 2010.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Superficial Sediments from Ghar El Melh Lagoon, Tunisia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85, 184–189.
- Ben Ameer, W., Trabelsi, S., El Megdiche, Y., Ben Hassine, S., Barhoumi, B., Hammami, B., Eljarrat, E., Barceló, D., Driss, M.R., 2013b.** Concentration of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in mullet (*Mugil cephalus*) and

- sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from Bizerte Lagoon (Northern Tunisia). *Chemosphere* 90, 2372–2380.
- Ben Garali, A., Ouakad, M., Gueddari, M., 2010.** Contamination of superficial sediments by heavy metals and iron in the Bizerte lagoon, northern Tunisia. *Arabian J. Geosci.* 3, 295–306.
- Ben Garali, A., Ouakad, M., Gueddari, M., 2013.** Episodic Sedimentation of Heavy Metals and Iron in Bizerte Lagoon, Northern Tunisia. *Int. J. Geosci.* 4, 24–35.
- Ben-Khedher, S., Jebali, J., Kamel, N., Banni, M., Rameh, M., Jrad, A., Boussetta, H., 2012.** Biochemical effects in crabs (*Carcinus maenas*) and contamination levels in the Bizerta Lagoon: an integrated approach in biomonitoring of marine complex pollution. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2616–2631.
- Bennasser, L., Fekhaoui, M., Seigle Murandi, F., Benoit Guyod, J.L., 1997.** Influence de la marée sur la qualité des eaux du bas Sebou soumis aux rejets industriels de la plaine du Rharb (Maroc). *Water Res.* 31, 859–867.
- Benoit, C., 2005.** Bio-géochimie et enregistrement des composés organostanniques dans les sédiments du Bassin d'Arcachon. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, France.
- Ben Said, O., Goñi-Urriza, M., El Bour, M., Aissa, P., Duran, R., 2010.** Bacterial Community Structure of Sediments of the Bizerte Lagoon (Tunisia), a Southern Mediterranean Coastal Anthropized Lagoon. *Microb. Ecol.* 59, 445–456.
- Ben Said, O., Goñi-Urriza, M.S., El Bour, M., Dellali, M., Aissa, P., Duran, R., 2008.** Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments. Tunisia. *J. Appl. Microbiol.* 104, 987–997.
- Berg, L.S., 1965.** Freshwater fishes of the U.S.S.R. and adjacent countries. Volume 3, 4th edition. Israel Program for Scientific Translations Ltd, Jerusalem. (Russian version published 1949).
- Berto, D., Ausili, A., Sunseri, G., Bellucci, L.G., Frignani, M., Albertazzi, S., Giani, M., 2009.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from diffuse sources in coastal sediments of a not industrialized Mediterranean island. *Water, Air, Soil Pollut.* 200, 199–209.
- Bervoets, L., Blust, R., 2003.** Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environ. Pollut.* 126, 9–19.

- Bervoets, L., Blust, R., De Wit, M., Verheyen, R., 1997.** Relationships between river sediment characteristics and trace metal concentrations in tubificid worms and chironomid larvae. *Environ. Pollut.* 95, 345–356.
- Besarati Nia, A., Kleinjans, J.C.S., Van Schooten, F.J., 2002.** Biomonitoring of tobacco smoke carcinogenicity by dosimetry of DNA adducts and genotyping and phenotyping of biotransformational enzymes: a review on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biomarkers* 7, 209–229.
- Beyer, J., Sandvikb, M., Hylland, M., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., Skåre, J.E., Gokssyr, A., 1996.** Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys jlesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sarrfjorden, Norway. *Aquat. Toxicol.* 36, 75–98.
- Beyrem, H., Mahmoudi, E., Essid, N., Hedfi, A., Boufahja, F., Aïssa P., 2007.** Individual and combined effects of cadmium and diesel on a nematode community in a laboratory microcosm experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 412–418.
- Billiard, S.M., Khan, R.A., 2003.** Chronic stress in cunner, *Tautogolabrus adspersus*, exposed to municipal and industrial effluents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 9–18.
- Billiard, S.M., Querbach, K., Hodson, P.V., 1999.** Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2070–2077.
- Binelli, A., Guzzella, L., Roscioli, C., 2008.** Levels and congener profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Zebra mussels (*D. polymorpha*) from Lake Maggiore (Italy). *Environ. Pollut.* 153, 610–617.
- Binelli, A., Provini, A., 2003.** POPs in edible clams from different Italian and European markets and possible human health risk. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 879–886.
- Blahová, J., Havelková, M., Kružíková, K., Hilscherová, K., Halouzka, R., Modrá, H., Grabic, R., Halířová, J., Jurčíková, J., Ocelka, T., Haruštiaková, D., Svobodová, Z., 2010.** Assessment of contamination of the Svitava and Svratka rivers in the Czech Republic using selected biochemical markers. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 541–549.
- Blanton, R.H., Lyte, M., Myers, M.J., Bick, P.H., 1986.** Immunomodulation by polyaromatic hydrocarbons in mice and murine cells. *Cancer Res.* 46, 2735–2739.
- Blumer, M., 1976.** Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci. Am.* 234, 35–45.
- Blus, L.J., 1995.** Organochlorine pesticides. In: Hoffmann, D.J., Rattner, B.A., Burton, J.A.G., Cairns, J.J (Eds.). *Handbook of ecotoxicology*. CRC Press, Boca Raton, pp 275–300.

- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006.** Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913–921.
- Bocquené, G., Galgani, F., 1998.** Biological effects of contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. In: *Proceedings of the ICES techniques in marine environmental sciences*, vol. 22. 12 p.
- Bocquené, G., Galgani, F., Walker, C.H., 1997.** Les cholinestérases, biomarqueurs de neurotoxicité. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiart, J.C., Ramade, F., (Eds.). *Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux*, Paris, pp 209–240.
- Bodin, N., Abarnou, A., Le Guellec, A.M., Loizeau, V., Philippon, X., 2007.** Organochlorine contaminants in decapod crustaceans from the coasts of Brittany and Normandy (France). *Chemosphere* 67, S36–S47.
- Bodin, N., Budzinski, H., LeMénach, K., Tapie, N., 2009.** ASE extraction method for simultaneous carbon and nitrogen stable isotope analysis in soft tissues of aquatic organisms. *Anal. Chim. Acta* 643, 54–60.
- Boening, D.W., 1999.** An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. *Environ. Monit. Assess.* 55, 459–470.
- Bolger, T., Connolly, P.L., 1989.** The selection of suitable indexes for the measurement and analysis of fish condition. *J. Fish Biol.* 34, 171–182.
- Bomboi, M.T., Hernandez, A., 1991.** Hydrocarbon in urban runoff: their contribution to the Wastewaters. *Water Res.* 25, 557–565.
- Bombardier, M., Bermingham, N., 1999.** The SED-TOX index: toxicity-directed management tool to assess and rank sediments based on their hazard – Concept and application. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 685–698.
- Booij, K., Theo, M., Hillerbrand, M.T.J., Nolting, R.F., Ooijen, J.V., 2001.** Nutrients, trace metals, organic contaminants in Banten Bay, Indonesia. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 1187–1190.
- Boon, J.P., Eijgenraam, F., Everaarts, J.M., Duinker, J.C., 1989.** A structure-activity relationship (SAR) approach towards metabolism of PCB in marine animals from different trophic levels. *Mar. Environ. Res.* 27, 159–176.
- Boon, J.P., Everaarts, J.M., Hillebrand, M.T.J., Eggens, M.L., Pijnenburg, J., Goksøyr, A., 1992.** Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels

- in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenyl mixture (Clophen A40). *Sci. Total. Environ.* 114, 113–133.
- Borgmann, U., 2000.** Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. *Aquat. Ecosys. Health Manage.* 3, 277–289.
- Borja, A., Franco, J., Perez, V., 2000.** A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments. *Mar. Poll. Bull.* 40, 1100–1114.
- Bostrom, C.E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernstrom, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Tornqvist, M., Westerholm, R., Victorin, K., 1999.** Cancer Risk Assessment, Indicators and Guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) in Ambient Air. Swedish Environmental Protection Agency, Stockholm.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Haeseler, F., Vandecasteele, J.P., 1996.** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. 1^{ère} partie: Propriétés, origines, devenir. *Oil Gas Sci. Technol.* 51, 407–419.
- Boufahja, F., 2010.** Approches communautaires et populationnelles de biosurveillance du milieu marin chez les nématodes libres (lagune et baie de Bizerte, Tunisie). Thèse de Doctorat, Université du 7 Novembre à Carthage, Tunisie.
- Bouguerra, M.L., 1985.** Les poisons du tiers mondes. Editions La Découverte Paris, 265 p.
- Bouloubassi, I., Saliot, A., 1991.** Sources and transport of hydrocarbons in the Rhone delta sediments (North western Mediterranean). *Fresenius J. Anal. Chem.* 339, 765–771.
- Boust, D., Fischer, J.-C., Ouddane, B., Petit, F., Wartel, M., Abarnou, A., Ficht, A., Gandon, R., Hebert, D., Hocdé, R., Poulin, M., Rozet, M., Voyer, J.-J., 1999.** Fer et manganèse: réactivités et recyclages. Programme scientifique Seine-Aval. Editions Ifremer, <http://seine-aval.crihan.fr/web/>
- Bowman, J.C., Zhou, J.L., Readman, J.W., 2002.** Sorption and desorption of benzo(a)pyrene in aquatic systems. *J. Environ. Monit.* 4, 761–766.
- Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., Deudero, S., 2007.** Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Phys. C.* 146, 531–539.
- Boyle, P., 1997.** Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: A review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996. *Lung Cancer* 17, 1–60.

- Bradford, M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Chem.* 772, 248–264.
- Brar, N.K., Waggoner, C., Reyes, J.A., Fairey, R., Kelley, K.M., 2010.** "Evidence for thyroid endocrine disruption in wild fish in San Francisco Bay, California, USA. Relationships to contaminant exposures." *Aquat. Toxicol.* 96, 203–215.
- Breivik, K., Alcock, R., Li, Y., Bailey, R.E., Fiedler, H., Pacyna, J.M., 2004.** Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories. *Environ. Pollut.* 128, 3–16.
- Brignon, J.M., Soleille, S., 2005.** Hexachlorobenzène. INERIS, fiche de données technicoéconomiques sur les substances chimiques en France, 13 p.
- Brinkworth, L.C., Hodson, P.V., Tabash, S., Lee, P., 2003.** CYP1A induction and blue sac disease in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to retene. *J. Toxicol. Environ. Health A* 66, 627–646.
- Brooks, S., Harman, C., Zaldibar, B., Izagirre, U., Glette, T., Marigómez, I., 2011.** Integrated biomarker assessment of the effects exerted by treated produced water from an onshore natural gas processing plant in the North Sea on the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 327–339.
- Brown, M.P., Mc Laughlin, J.J.A., O'Connor J.M., Wyman K., 1982.** A mathematical model of PCB accumulation in plankton. *Ecol. Modelling* 15, 29–47.
- BSEF, 2003.** Major brominated flame retardants volume estimates. Available from: http://www.bsef.com/bromine/our_industry/.
- Buckman, A.H., Fisk, A.T., Parrott, J.L., Solomon, K.R., Brown, S.B., 2007.** "PCBs can diminish the influence of temperature on thyroid indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Aquat. Toxicol.* 84, 366–378.
- Buckman, A.H., Wong, C.S., Chow, E.A., Brown, S.B., Solomon, K.R., Fisk, A.T., 2006.** Biotransformation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and bioformation of hydroxylated PCBs in fish. *Aquat. Toxicol.* 78, 176–185.
- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, T.A., Heckelman, P.E., Kinneary, J.F., 1996.** The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Twelfth edition. USA: Merck et Co., Inc. 1741 p.

- Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Pierrad, C., Garrigues, P., 1997.** Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar. Chem.* 58, 85–97.
- Budzinski, H., Letellier, M., Thompson, S., LeMenach, K., Garrigues, P., 2000.** Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367, 165–171.
- Budzinski, H., Raymond, N., Nadalig, T., Gilewicz, M., Garrigues, P., Bertrand, J.C., Caumette, P., 1998.** Aerobic biodegradation of alkylated aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *Org. Geochem.*, 28, 337–348.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978.** [30] Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymol.* 52, 302–310.
- Burgeot, T., Bocquéné, G., Truquet, P., Le Dean, L., Galgani, F., 1994.** Induction of EROD activity in red mullet (*Mullus barbatus*) along the French Mediterranean coasts. *Sci. Total Environ.* 142, 213–220.
- Burger, J., Gochfeld, M. et Jewett, S., 2006.** Selecting species for marine assessment of radionuclides around Amchitka : planning for diverse goals and interests. *Environ. Monit. Assess.* 123, 371–391.
- Burgess, R.M, Morrison, G.E., 1994.** A short-term exposure, sublethal, sediment toxicity test using the marine bivalve *Mulinia lateralis*: statistical design and comparative sensitivity. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 571–580.
- Burgess, R.M, Schweitzer, K.A., McKinney, R.A., Phelps, D.K., 1993.** Contaminated marine sediment: water column and interstitial toxic effect. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 127–138.
- Burgess, R.M., Scott, K.J., 1992.** The Significance of In-Place Contaminated Marine Sediments on the Water Column : Processes and Effects. In: Burton, G.A.J., (Eds.). *Sediment Toxicity Assessment*, Lewis, Chelsea, MI, USA. pp 129–165.
- Burke, M.D., Mayer, R.T., 1974.** Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methyl-cholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* 2, 583–588.
- Burreau, S., Zebuhr, Y., Broman, D., Ishaq, R., 2004.** Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) studied in pike (*Esox*

lucius), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) from the Baltic Sea. *Chemosphere* 55, 1043–1052.

Burton Jr, G.A., 1991. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1585–1627.

Burton, G.A., 1992. Sediment Collection and Processing: Factors Affecting. In: Burton, G.A.J., (Eds.). *Sediment Toxicity Assessment*, Lewis, Chelsea, MI, USA. pp 37–54.

Butler, P.A., Andren, L., Bonde, G.J., Jernelov, A., Reisch, D.J., 1971. Monitoring organisms. *FAO Conference on marine pollution and its effects on living resources and fishing*. Rome, *FAO fisheries report* 99, Suppl. 1, 101–112.



Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat. Toxicol.* 79, 257–267.

Cachot, J., Law, M., Pottier, D., Peluhet, L., Norris, M., Budzinski, H., Winn, R., 2007. Characterization of Toxic Effects of Sediment-Associated Organic Pollutants Using the Transgenic Medaka. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7830–7836.

Cahen, D., 2006. Dossier didactique, moule natures, Muséum des Sciences naturelles.

Cajarville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311.

Cajarville, M.P., Orbea, A., Marigomez, I., Cancio, I., 1997. Peroxisome proliferation in the digestive epithelium of mussels exposed to the water accommodated fraction of three oils. *Comp. Biochem. Phys. C.* 117, 233–242.

Calow, P., 1994. *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Royaume-Uni.

Camacho-Ibar, V.F., McEvoy, J., 1996. Total PCBs in Liverpool Bay sediments. *Mar. Environ. Res.* 41, 241–263.

- Campbell, P.G.C., Lewis, A.G., Chapman, P.M., Crowder, A.A., Fletcher, W.K., Imber, B., Luoma, S.N., Stokes, P.M., Winfrey, M., 1988.** Biological Available Metals in Sediments NRCC No 27694, Ottawa.
- Cao, L., Huang, W., Shan, X., Xiao, Z., Wang, Q., Dou, S., 2009.** Cadmium toxicity to embryonic-larval development and survival in red sea bream *Pagrus major*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1966–1974.
- Cappello, T., Maisano, M., D'Agata, A., Natalotto, A., Mauceri, A., Fasulo, S., 2013.** Effects of environmental pollution in caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Mar. Environ. Res.* 91, 52–60.
- Carls, M.G., Holland, L., Larsen, M., Collier, T.K., Scholz, N.L., Incardona, J.P., 2008.** Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. *Aquat. Toxicol.* 88, 121–127.
- Carls, M.G., Rice, S.D., Hose, J.E., 1999.** Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 481–493.
- Carlson, E.A., Li, Y., Zelikoff, J.T., 2002.** Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquat. Toxicol.* 56, 289–301.
- Carr, R.S., 1998.** Marine and Estuarine porewater toxicity testing. In *Microscale Testing and Aquatic Toxicology Advances, techniques and Practice*. Edited by P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise. CRC Press, Boca Raton, chap. 36, 523–537.
- Carr, R.S., Chapman, D.C., Howard, C.L., Biedenbach, J., 1996b.** Sediment Quality Triad assessment survey in Galvestone Bay, Texas system. *Ecotoxicology* 5, 1–25.
- Carr, R.S., Chapman, D.C., Presley, B.J., Biedenbach, J., Roberston, L., Boothe, P.N., Kilada, R., Wade, T.L., Montagna, P., 1996a.** Sediment pore-water toxicity assessment studies in the vicinity of offshore oil and gas production platforms in the Gulf of Mexico. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 53, 2618–2628.
- Carr, R.S., Williams, J.W., Fragata, C.T.B., 1989.** Development and evaluation of a Novel Marine Sediment Pore Water Toxicity Test with the Polychaete *Dinophilus gyrocilatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 533–543.
- Casillas, E., Misitano, D., Johnson, L.L., Rhodes, L.D., Collier, T.K., Stein, J.E., McCain, B. B., Varanasi, U., 1991.** "Inducibility of spawning and reproductive success of

- female english sole (*Praphrys vetulus*) from urban and nonurban areas of puget sound, Washington." Mar. Environ. Res. 31, 99–122.
- Catsiki, V.A., Hatzianestis, I., Rigas, F., 2003.** Distribution of metals and organic contaminants in mussels from Thermaikos Gulf. Global Nest J. 5, 119–126.
- CCME, 2002.** Canadian environmental quality guidelines, Winnipeg.
- CEPA, 2006.** Ecological Screening Assessment Report on Polybrominated Diphenyl Ethers (Canadian Environmental Protection Act, 1999), Environment Canada.
- Cerniglia, C.E., 1993.** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Curr. Opin. Biotechnol. 4, 331–338.
- Cesnaitis, R., Sobanska, M.A., Versonnen, B., Sobanski, T., Tarazona, J.V., De Coen, W., 2013.** Analysis of the ecotoxicity data submitted within the framework of the REACH Regulation. Part 3. Experimental sediment toxicity assays. Sci. Total Environ. 475, 116–122.
- Champeau, O., 2005.** Biomarqueurs d'effets chez *C. fluminea*: du développement en laboratoire à l'application en mésocosme. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, France.
- Chandler, J.R., 1970.** A biological approach to water quality management. Water Pollut. Control. 69, 415–422.
- Chaouachi, B., Ben Hassine, O.K., 1998.** The Status of fish biodiversity in Ichkeul lagoon (Tunisia). Ital. J. Zool. 65, 303–304.
- Chaouachi, B., Ben Hassine, O.K., 2001.** Caractéristiques Biométriques des Gobiidés (poissons téléostéens) de la lagune de l'Ichkeul. Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô, Vol. 28, 2001.
- Chapman, P.M., 1990.** The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. Sci. Total Environ. 97/98, 815–825.
- Chapman, P.M., 1992.** Sediment quality triad approach. Sediment Classification Methods Compendium. US EPA, Washington, D.C. EPA-823-R-92-006.
- Chapman, P.M., Ho, K.T., Munns, W.R.Jr., Solomon, K., Weinstein, M.P., 2002.** Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. Mar. Pollut. Bull. 44, 271–278.
- Chapman, P.M., Morgan, J.D., 1983.** Sediment bioassays with oyster larvae. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 31, 438–444.

- Chapman, P.M., Power, E.A., Dexter, R.N., Andersen, H.B., 1991.** Evaluation of effects associated with an oil platform using the sediment quality triad. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 407–424.
- Chapman, P.M., Wang, F., Janssen, C., Persoone, G., Allen, H.E., 1998.** Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Can. J. fish Aquat. Sci.* 55, 2212–2243.
- Chapman, R.A., Cole, C.M., 1982.** "Observations on the influence of water and soil pH on the persistence of insecticides." *J. Environ. Sci. Health, Part B*, 17, 487–504.
- Chapman, R.A., Harris, C.R., 1982.** "Persistence of isofenphos and isazophos in a mineral and an organic soil." *J. Environ. Sci. Health. B* 17, 355–361.
- Charriau, A., 2009.** Etude de la contamination organique et métallique associée aux sédiments du district hydrographique international de l'Escaut. Thèse de doctorat, Université Lille 1, France.
- Chau, K.W., 2005.** Characterization of transboundary POP contamination in aquatic ecosystems of Pearl River Delta. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 960–965.
- Cheikh, M., Derouiche, A., Driss, M.R., 2002.** Détermination par (CPG-ECD) des résidus de pesticides organochlorés dans les sédiments de la lagune de Bizerte. *Bull. Inst. Nat. Sci. Technol. Mer.* 7, 160–163.
- Chen, G., White, P.A., 2004.** The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat. Res.* 567, 151–225.
- Cheng, J.O., Ko, F.C., Li, J.J., Chen, T.H., Cheng, Y.M., Lee, C.L., 2011.** Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbon in the surface sediments from inter-tidal areas of Kenting coast, Taiwan. *Environ. Monit. Assess.* 184, 3481–3490.
- Chernyak, S.M., Rice, C.P., McConnell, L.L., 1996.** Evidence of currently-used pesticides in air, ice, fog, seawater and surface microlayer in the Bering and Chukchi Seas. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 410–419.
- Chessman, B.C., McEvoy, P.K., 1998.** Towards diagnostic biotic indices for river macroinvertebrates. *Hydrobiol.* 364, 169–182.
- Cheung, Y.H., Neller, A., Chu, K.H., Tam, N.F.Y., Wong, C.K., Wong, Y.S., Wong, M.H., 1997.** Assessment of sediment toxicity using different trophic organisms. *Arch. Environ. Toxicol. Chem.* 32, 260–267.

- Chiffolleau, J.F., Claisse, D., Cossa, D., Ficht, A., Gonzalez, G., Guyot, T., Michel, P., Miramand, P., Oger, C., Petit, F., 2001.** La contamination métallique, Rapport du Programme scientifique Seine-Aval, 39p.
- Chiou, C.T., McGroddy, S.E., Kile, D.E., 1998.** Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 32, 264–269.
- Chu, F.-L.E., Soudant, P., Hale, R.C., 2003.** Relationship between PCB accumulation and reproductive output in conditioned oysters *Crassostrea virginica* fed a contaminated algal diet. *Aquat. Toxicol.* 65, 293–307.
- Cincinelli, A., Stortini, A.M., Perugini, M., Checchini, L., Lepri, L., 2001.** Organic pollutants in sea-surface microlayer and aerosol in the coastal environment of Leghorn—(Tyrrhenian Sea). *Mar. Chem.* 76, 77–98.
- Claiborne, A., 1985.** Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.), *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, pp 283–284.
- Clark, R.B., 2001.** *Marine Pollution*. Oxford University Press, Oxford.
- Coimbra, A.M., Reis-Henriques, M.A., 2005.** "Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., reproduction inhibition by dietary exposure to Aroclor 1254." *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 407–412.
- Colombo, J.C., Pelletier, E., Brochu, C., Khalil, M., Catoggio, J.A., 1989.** Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Rio de La Plata estuary, Argentina. *Environ. Sci. Technol.* 23, 888–894.
- Conell, D.W., Miller, G.J., 1984.** *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. Wiley-Interscience Publishers, USA, 444 p.
- Connel, D.W., Hawker, D.W., Warne, M.J., Vowles, P.P., 1997.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In: McCombs, K., Starkweather, A.W., (Eds.), *Introduction into environmental chemistry*. Boca Raton, CRC, pp 205–217.
- Connell, D.W., 1988.** Bioaccumulation behavior of persistent organic chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102, 117–154.
- Connolly, J.P., Glaser, D., 2002.** p,p'-DDE bioaccumulation in female sea lions of the California Channel Islands. *Cont. Shelf Res.* 22, 1059–1078.
- Convention de Stockholm, 2007.** Plan d'action national de la Tunisie pour la mise en oeuvre de la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants, Janvier 2007.
- Cornu, P., 2012.** Les Polychlorobiphényles: Enjeux environnementaux etsanitaires, et mycoremédiation. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier, France.

- Cossa, D., 1985.** Le cadmium et le mercure en milieu côtier : biogéochimie et utilisation du genre *Mytilus galloprovincialis* comme indicateur quantitatif. Thèse de Doctorat d'état, Université de Bretagne Occidentale, Brest. 387 p.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P., 1997.** Mécanismes de formation and effects des espèces réactives de l'oxygène. In: Lagdic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., (Eds.), Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux. Masson, Londres, Paris, New York, pp 1–9.
- Costanza, R., D'Arge, R., DeGroot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R.V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., van den Belt, M., 1997.** The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253–260.
- Costes, J.M., Druelle, V., 1997.** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement: La réhabilitation des anciens sites industriels. *Rev. Inst. Franc. Pétr.* 52, 425–435.
- Countway, R.E., Dickhut, R.M., Canuel, E.A., 2003.** Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) distributions and associations with organic matter in surface waters of the York River, VA Estuary. *Org. Geochem.* 34, 209–224.
- Courtneyk, D., 1979.** Hexachlorobenzène (HCB) : A Review, *Environ. Res.* 20, 225–266.
- Cravedi, M., Narbonne, J.F., 2002.** Données récentes sur l'évaluation des dangers liés à la présence de PCB dans l'alimentation. Rapport AFSSA, 52 p.
- Cravo, A., Lopes, B., Serafim, A., Company, R., Barreira, L., Gomes, T., Bebianno, M.J., 2009.** A multibiomarker approach in *Mytilus galloprovincialis* to assess environmental quality. *J. Environ. Monit.* 11, 1673–1686.
- CRC, 2010.** Mytiliculture. Publication du Comité Régional de la Conchyliculture Bretagne Sud. Htto: <http://www.hitres-de-bretagne.com/mytiliculture>.
- CRDA, 1998.** (Commissariat régional au développement agricole de Bizerte). Statistiques annuelles de l'arrondissement de la pêche. Bizerte.
- CRDA, 2002.** (Commissariat régional au développement agricole de Bizerte). Statistiques annuelles de l'arrondissement de la pêche. Bizerte.
- Cripe, G.M., Carr, R.S., Foss, S.S., Harris, P.S., Stanley, R.S., 2000.** Effects of whole sediment from Corpus Christy Bay on survival, growth and reproduction of the mysid *Americamysis bahia* (formerly *Mysidopsis bahia*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 426–433.

Culotta, L., De Stefano, C., Gianguzza, A., Mannino, M. R., Orecchio, S., 2006. The PAH composition of surface sediments from Stagnone coastal lagoon, Marsala (Italy). *Mar. Chem.* 99, 117–127.



D'Adamo, R., Di Stasio, M., Fabbrochini, A., 2008. Migratory crustaceans as biomonitors of metal pollution in their nursery areas. The Lesina lagoon (SE Italy) as a case study. *Environ. Monit. Assess.* 143, 15–24.

Damiens, G., His, E., Gnassia-Barelli, M., Quiniou, F., Roméo, M., 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comp. Biochem. Phys. C.* 138, 121–128.

Dang, T.H., 2011. Erosion et transferts de matières en suspension, carbone et métaux dans le bassin versant du fleuve rouge depuis la frontière sino-vietnamienne jusqu'à l'entrée du delta. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 1, France.

Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., Quentel, C., 2012. Effects of in vivo chronic exposure to pendimethalin/Prowl 400® on sanitary status and the immune system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ.* 424, 143–154.

Darnerud, P.O., 2003. Toxic effects of brominated flame retardants in man and wildlife. *Environ. Int.* 29, 841–853.

Dave, G., Xiu, R., 1991. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 126–134.

Davol, P., Donnelly K.C., Brown, K.W., Thomas, J.C., Estiri, M., Jones, D.H., 1989. Mutagenic potential of runoff water from soils amended with three hazardous industrial wastes. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 189–200.

Day, K.E., Scott, I.M., 1990. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquat. Toxicol.* 18, 101–114.

Deal, C.L., 1995. The role of metabolic activation in BaP-induced suppression of the humoral immune response. Thèse de doctorat, Université Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia.

- Dean, J.H., Luster, M.I., Boorman, G.A., 1983.** Selective immunosuppression resulting from exposure to the carcinogenic congener of benzopyrene in B6C3F1 mice. Clin. Exp. Immunol. 52, 199–206.
- De Boer, J., de Boer, K., Boon, J.P., 2000.** Polybrominated biphenyls and diphenylethers. Handb. Environ. Chem. 3, 61–95.
- De Boer, J., Wester, P.G., Rodriguez, D.P., Lewis, W.E., Boon, J.P., 1998.** Polybrominated biphenyls and diphenyl ethers in sperm whales and other marine mammals-a new threat to ocean life ?. Organohalogen Compd. 35, 383–386.
- De Casabianca, M.L., Kiener, A., 1969.** Gobiidés des étangs Corses: Systématique, écologie, régime alimentaire et position dans les chaînes trophiques. Vie Milieu, sér. A, 20, 611–634.
- De Fages, E., Ponzevera, C., 1903.** Les pêches maritimes en Tunisie. 2^{ème} Edition. Eds. Picards Tunis, 323 p.
- De Flora, S., Bagnasco, M., Zancchi, P., 1991.** Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. Mutat. Res. 258, 285–320.
- De Geus, H.J., Besselink, H., Brouwer, A., Klungsoyr, J., McHugh, B., Nixon, E., Rinkus, G.G., Wester, P.G., de Boer, J., 1999.** Environmental occurrence, analysis, and toxicology of toxaphene compounds. Environ. Health. Perspect. 107, 115–144.
- De Kruif, C.G., 1980.** Enthalpies of sublimation and vapour pressures of 11 polycyclic hydrocarbons. J. Chem. Thermodyn. 12, 243–248.
- Dellali, M., Gnassia Barelli, M., Romeo, M., Aissa, P., 2001b.** The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. Comp. Biochem. Physiol. C 130, 227–235.
- Dellali, M., Romeo, M., Aissa, P., 2001a.** Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. Oceanol. Acta 24, 263–271.
- Dellali, M., Romeo, M., Gnassia-Barelli, M., Aïssa, P., 2004.** A multivariate data analysis of the clam *Ruditapes decussatus* as sentinel organism of the Bizerta lagoon (Tunisia). Water, Air, and Soil Pollution 156, 131–144.
- De Luca, G., Furesi, A., Leardi, R., Micera, G., Panzanelli, A., Costantina Piu, P., Sanna, G., 2004.** Polycyclic aromatic hydrocarbons assessment in the sediments of the Porto Torres Harbor (Northen Sardinia, Italy). Mar. Chem. 86, 15–32.

- De Luca-Abbott, S.B., Richardson, B.J., McClellan, K.E., Zheng, G.J., Martin, M., Lam, P.K.S., 2005.** Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. Mar. Pollut. Bull. 51, 694–707.
- De Mora, D., Villeneuve, J.-P., Sheikholeslami, M.R., Cattini, C., Tolosa, I., 2004.** Organochlorinated compounds in Caspian Sea sediments. Mar. Pollut. Bull. 48, 30–43.
- Derouiche, A., Sanda, Y.G., Driss, M.R., 2004.** Polychlorinated biphenyls in sediments from Bizerte lagoon, Tunisia. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 73, 810–817.
- DeShon, J.E., 1995.** Development and application of the invertebrate community index (ICI). Dans: Davis, W.S., Simon, T.P., (Éds.). Biological assessment and criteria. Tools for water resource planning and decision making. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. pp 217–243.
- Deudero, S., Box, A., March, D., Valencia, J.M., Grau, A.M., Tintore, J., Calvo, M., Caixach, J., 2007.** Organic compounds temporal trends at some invertebrate species from the Balearics, Western Mediterranean. Chemosphere 68, 1650–1659.
- Deviller, G., Palluel, O., Aliaume, C., Asanthi, H., Sanchez, W., Franco, N., Blancheton, J.P., Casellas, C., 2005.** Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. Ecotoxicol. Environ. Saf. 61, 89–97.
- De Wit, C.A., 2002.** An overview of brominated flame retardants in the environment. Chemosphere 46, 583–624.
- DeWitt, T.H., Ditsworth, G.R., Swartz, R.C., 1988.** Effects of Natural Sediment Features on the Phoxocephalid Amphipod, *Rhepoxynius abronius*: Implication for Sediment Toxicity Bioassays. Mar. Environ. Res. 25, 99–124.
- DGPA, 1999.** Direction Générale de la Pêche et de l'Aquaculture.
- Di Giulio, R.T., Habig, C., Gallagher, E.P., 1993.** Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. Aquat. Toxicol. 26, 1–22.
- Di Giulio, R.T., Wasburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S., 1989.** Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. Environ. Toxicol. Chem. 8, 1103–1123.
- Di Salvatore, P., Calcagno, J.A., Ortiz, N., Ríos de Molina, M.D.C., Sabatini, S.E., 2013.** Effect of seasonality on oxidative stress responses and metal accumulation in soft tissues of

- Aulacomya atra, a mussel from the South Atlantic Patagonian coast. Mar. Environ. Res. 92, 244–252.
- Dobson, S., Van Esch, G.H., 1993.** Environmental Health Criteria 140. Polychlorinated biphenyls and terphenyls, 2nd edition, WHO, Geneva, 682 p.
- Doerr, B., Liebezeit, G., 2009.** Organochlorine compounds in blue mussels, *Mytilus edulis*, and Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, from seven sites in the Lower Saxonian Wadden Sea, Southern North Sea. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 83, 874–889.
- Donnelly, K.C., Brown, K.W., Anderson, C.S., Barbee, G.C., Safe, S.H., 1990.** Metabolism and bacterial mutagenicity of binary mixtures of benzo(a)pyrene and polychlorinated aromatic hydrocarbons. Environ. Mol. Mutagen. 16, 238–245.
- Doong, R., Lin, Y., 2004.** Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations in surface sediment and water from Gao-ping River, Taiwan. Water Res. 38, 1733–1744.
- DRDA, 2003.** Direction Régionale du Développement Agricole de Bizerte (Arrondissement de la Pêche Maritime - Zarzouna).
- DRDA, 2008.** Direction Régionale du Développement Agricole de Bizerte (Arrondissement de la Pêche Maritime - Zarzouna).
- Duarte, C.A., Giarratano, E., Amin, O.A., Comoglio, L.I., 2011.** Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). Mar. Pollut. Bull. 62, 1895–1904.
- Dutka, B.J., 1998.** Foreword. In « Microscale testing in aquatic toxicology », Wells P.G., LEE K., Blaise C. (ed.), CRC Press, Boca Raton.
- Dutka, B.J., McInnis, R., Jurkovic, A., Liu, D., 1996.** Water and Sediment Ecotoxicity Studies in Temuco and Rapel River Basin, Chile. Environ. Toxicol. Water Qual. 11, 237–247.
- Dutka, B.J., Tuominen, T., Churchland, L., Kwan, K.K., 1989.** Fraser river sediments and waters evaluated by the battery of screening tests and techniques. Hydrobiologia 188–189, 301–315.
- Duursma, E.K., Nieuwenhuize, J., Van Liere, J.M., 1986.** Partitioning of organochlorines between water, particulate matter and some organisms in estuarine and marine systems of the Netherlands. Neth. J. Sea. Res. 20, 239–251.



- Edgar, P.J., Hursthouse, A.S., Matthews, J.E., Davies, I.M., Hillier, S., 2006.** Sediment influence on congener-specific PCB bioaccumulation by *Mytilus edulis*: a case study from an intertidal hot spot, Clyde Estuary, UK. *J. Environ. Monit.* 8, 887–96.
- Eertman, R.H.M., Groenink-van Emstede, M., Sandde, B., 1993.** The effects of the polycyclic aromatic hydrocarbons fluoranthene and benzo(a)pyrene on the mussel *Mytilus edulis*, the amphipod *Bathyporeia sarsi* and larva of the oyster, *Crassostrea gigas*. BEON-Efecten, DGW-NIOO, 50 p.
- Eggleton, J., Thomas, K.V., 2004.** A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environ. Int.* 30, 973–980.
- Eitzer, B.D., Iannucci-Berger, W., Mattina, M.I., 2003.** Volatilization of weathered chiral and achiral chlordane residues from soil. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4887–4893.
- El Ati Hellal, M., Hellal, F., El Khemissi, Z., Jebali, R., Dachraoui, M., 2011.** Trace metals in algae and sediments from the north-eastern Tunisian lagoons. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86, 194–198.
- Ellman, G.L., Courtney, K.O., Anders, V., Featherstone, R.M., 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Elumalai, M., Antunes, C., Guilhermino, L., 2002.** Single metals and their mixtures on selected enzymes of *Carcinus maenas*. *Water, Air, Soil Pollut.* 141, 273–280.
- Ennaceur, S., Gandoura, N., Driss, M.R., 2008.** Distribution of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human breast milk from various locations in Tunisia: Levels of contamination, influencing factors, and infant risk assessment. *Environ. Res.* 108, 86–93.
- Environnement Canada, 1992.** Méthode d'essai biologique: essai de toxicité sur la bactérie luminescente *Photobacterium phosphoreum*, SPE 1/RM/24, no. cat. En49-24/1-24F, ISBN 0-662-98128-6.
- EPA, 1994.** Methods for Assessing the Toxicity of Sediment-associated Contaminants with Estuarine and Marine Amphipods. 600/R-94/025.

- Eriksson, J., Green, N., Marsh, G., Bergman, A., 2004.** Photochemical Decomposition of 15 Polybrominated Diphenyl Ether Congeners in Methanol/Water. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3119–3125.
- Eriksson, M., Sodersten, E., Yu, Z., Dalhammar, G., Mohn, W.W., 2003.** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 275–284.
- Essid, N., 2008.** Caractérisation de la pollution organique et minérale des sédiments de la lagune de Bizerte et impact écologique sur les peuplements des nématodes libres: étude à grande échelle et au niveau d'un parc mytilicole. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de Bizerte, Tunisie, 303 p.
- Essid, N., Aissa, P., 2002.** Etude quantitative des nématodes libres des secteurs Nord et Est de la lagune de Bizerte (Tunisie). *Bull. Inst. Natl. Sci. Technol. Mer. Salammbô Tunisia* 29, 53–63.
- Etcheber, H., Taillez, A., Abril, G., Garnier, J., Servais, P., Moatar, F., Commarieu, M.V., 2007.** Particulate organic carbon in the estuarine turbidity maxima of the Gironde, Loire and Seine estuaries: origin and lability. *Hydrobiologia* 588, 245–259.
- Eto, M., 1974.** Organophosphorus Pesticides. *Organic and Biological Chemistry*. CRC Press, Ohio.



- Fabre, B., Roth, E., Heintz, V., 2005.** Les isomères de l'hexachlorocyclohexane. Propriétés physico-chimiques, niveaux de contamination, toxicité, techniques de dosage, sites pollués et techniques de traitement, aspects juridiques. Université de Haute Alsace – ADEME, 126 p.
- FAO, 1985. Species identification sheets: MUGIL vala 3, fishing area 51 (W. Indian Ocean), 8 p.
- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., Wood, W., 2007.** Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 145–227.

- Fang, M., Hsieh, P.C., Ko, F.C., Baker, J.E., Lee, C.L., 2007.** Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of Kaoping river and submarine canyon system, Taiwan. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1179–1189.
- Farwell, A., Nero, V., Croft, M., Bal, P., Dixon, D.G., 2006.** Modified Japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 600–607.
- Fernandes, D., Porte, C., Bebianno, M.J., 2007.** Chemical residues and biochemical responses in wild and cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Environ. Res.* 103, 247–256.
- Fernandes, D., Zanuy, S., João Bebianno, M., Porte, C., 2008.** Chemical and biochemical tools to assess pollution exposure in cultured fish. *Environ. Pollut.* 152, 138–146.
- Fernandes, M.B., Sicre, M.A., Boireau, A., Tronszynski, J., 1997.** Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 34, 857–867.
- Ferreira, M., Antunes, P., Gil, O., Vale, C., Reis-Henriques, M.A., 2004.** Organochlorine contaminants in founder (*Platichthys fesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* 69, 347–357.
- Fichet, D., Radenac, G., Miramand, P., 1998.** Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 509–518.
- Fisher, B.E., 1999.** Most unwanted Persistent Organic Pollutants. *Environ. Health. Perspect.* 107, A18–A23.
- Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh, A.R., 1997.** Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers* 2, 51–56.
- Fitzpatrick, P.J., Sheehan, D., 1993.** Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Xenobiotica* 23, 851–861.
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P., Garric, J., 2002b.** Multi-biomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 145–153.

- Flammarion, P., Fortier, V., Migeon, B., Morfin, P., Garric, J., 1999.** Cytochrome p450 1A induction in gudgeon (*Gobio gobio*): Laboratory and field studies. *Biomarkers* 4, 59–71.
- Flammarion, P., Migeon, B., Garric, J., 1996.** Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 440–445.
- Flammarion, P., Migeon, B., Garric, J., 1998b.** Statistical analysis of cyprinids EROD data in a large french watershed. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40, 144–153.
- Flammarion, P., Migeon, B., Urios, S., Morfin, P., Garric, J., 1998a.** Effect of Methidathion on the cytochrome P450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquat. Toxicol.* 42, 93–102.
- Flammarion, P., Noury, P., Garric, J., 2002a.** The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environ. Pollut.* 120, 325–330.
- Fleming, H.P., Adalberto, J., Asencio, P., Gutierrez, E., 2004.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of Corral Bay, south central Chile. *Environ. Monit.* 6, 229–223.
- Förlin, L., Blom, S., Celander, M., Sturve, J., 1996.** Effects on UDP glucuronosyl transferase, glutathione transferase, DT-diaphorase and glutathione reductase activities in rainbow trout liver after long-term exposure to PCB. *Mar. Environ. Res.* 42, 213–216.
- Forster, G.D., Wright, D.A., 1988.** Unsubstituted polynuclear aromatic hydrocarbons in sediments, clams, and clam worms from Chesapeake Bay. *Mar. Pollut. Bull.* 19, 459–465.
- Franco, A., Malavasi, S., Pranovi, F., Franzoi, P., Torricelli, P., 2002b.** Preliminary data on gonadal development and fecundity in the Grass goby, *Zosterisessor ophiocephalus* (Pallas, 1811) from the Venice lagoon (northern Italy). *Acta Adriat.* 43, 43–48.
- Franco, A., Malavasi, S., Pranovi, F., Nasci, C., Torricelli, P., 2002a.** Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity and fluctuating asymmetry (FA) in *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei, Gobiidae) as indicators of environmental stress in the Venice lagoon. *J. Aquat. Ecosyst. Stress recovery*, 9, 239–247.
- Franco, M.A., Viñas, L., Soriano, J.A., de Armas, D., González, J.J., Beiras, R., Salas, N., Bayona, J.M., Albaigés, J., 2006.** Spatial distribution and ecotoxicity of petroleum hydrocarbons in sediments from the Galicia continental shelf (NW Spain) after the Prestige oil spill. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 260–271.

- Fränze, O., 2003.** Bioindicators and environmental stress assessment. In: Market, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G., (Eds.), Bioindicators and biomonitors: principles, concepts and applications, Amsterdam, pp 41–84.
- Freeman, H.C., Idler, D.R., 1975.** The effect of polychlorinated biphenyl on steroidogenesis and reproduction in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Can. J. Biochem. 53, 666–670.
- Frisoni, G.F., Guelorget, O., Pertuisot, J.P., Fresi, E., 1986.** Diagnose écologique et zonation biologique du lac de Bizerte. Applications aquacoles. Rapport du projet MEDRAP : régional Mediterranean developpement of aquaculture. FAO: 41 p.
- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001.** Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. Environ. Toxicol. Chem. 20, 37–45.



- Gabbott, P.A., 1983.** Developmental and seasonal changes metabolic activities in marine molluscs. In: Hochachka, P.W., (Ed.), The Mollusca, Environmental Biochemistry and Physiology, vol. 2. Academic Press, New York, pp 165–217.
- Gagné, F., Pardos, M., Blaise, C., Turcotte, P., Quémerais, B., Fouquet, A., 1999.** Toxicity evaluation of organic sediment extracts resolved by size exclusion chromatography using rainbow trout hepatocytes. Chemosphere 39, 1545–1570.
- Galgani, F., Bocquené, G., 1998.** Biomarqueurs moléculaires d'exposition des organismes marins aux pesticides organophosphorés et carbamates. In: Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F., (Eds.), Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement, Tech&Doc Lavoisier, Paris, pp 111–134.
- Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2001.** Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. Ecotoxicol. 10, 5–23.
- Garali, A.B., Ouakad, M., Gueddari, M., 2010.** Contamination of superficial sediments by heavy metals and iron in the Bizerte lagoon, northern Tunisia. Arabian J. Geosci. 3, 295–306.
- Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L., López López, T., Cortés Aguado, S., Martínez Salvador, I., 2004.** Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and

- vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1048, 199–206.
- Geacintov, N.E., Cosman, M., Hingerty, B.E., Amin, S., Broyde, S., Patel, D.J., 1997.** NMR solution structures of stereoisomeric covalent polycyclic aromatic carcinogen-DNA adduct: principles, patterns, and diversity. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 111–146.
- Geffard, O., 2001.** Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants étudiés. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux 1, France.
- Geptner, A.R., Richter, B., Pikovskii, Y.I., Chernyansky, S.S., Alekseeva, T.A., 2006.** Hydrothermal polycyclic aromatic hydrocarbons in marine and lagoon sediments at the intersection between Tjörnes Fracture Zone and recent rift zone (Skjálfandi and Öxarfjörður bays), Iceland. *Mar. Chem.* 101, 153–165.
- Geret, F., Serafim, A., Bebianno, M.J., 2003.** Antioxidant Enzyme Activities, Metallothioneins and Lipid Peroxidation as Biomarkers in *Ruditapes decussatus*? *Ecotoxicol.* 12, 417–426.
- Giesy, J.P., Hoke, R.A., 1989.** Fresh-water sediment toxicity bioassessment – Rationale for species selection and test design. *J. Great Lakes Res.* 15, 539–569.
- Giuliani, S., Sprovieri, M., Frignani, M., Cu, N.H., Mugnai, C., Bellocchi, L.G., Albertazzia, S., Romanoa, S., Luisa Feob, M., Marsellab, E., Hoai Nhonc, D., 2008.** Presence and origin of polycyclic aromatic hydrocarbon in sediments of nine coastal lagoons in central Vietnam. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1486–1512.
- Gobas, F.A.P.C., Morrison, H.A., 2000.** Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. In: Boethling, R.S., Mackay, D., (Eds.), *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals: Environmental and Health Sciences*, Lewis, Boca Raton, Florida, USA, pp 189–231.
- Gobas, F.A.P.C., Zhang, X., 1994.** Interactions of Organic Chemicals with Organic Matter in the Aquatic Environment. In: Hamelink, J.L., Landrum, P.F., Bergman, H.L., Benson, W.H., (Eds.), *Special Publication on "Bioavailability: Physical, Chemical and Biological Interactions"*, Lewis Publishers, Chelsea, MI, pp 83–91.
- Goerke, H., Weber, K., Bornemann, H., Ramdohr, S., Plotz, J., 2004.** Increasing levels and biomagnification of persistent organic pollutants (POPs) in Antarctic biota. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 295–302.

- Goksoyr, A., Husoy, A.-M., 1992.** The cytochrome P450 1A1 response in fish: Application of immunodetection in environmental monitoring and toxicological testing. *Mar. Environ. Res.* 34, 147–150.
- Goldberg, E.D., 1975.** The mussel watch. A first step in global marine monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 6, 111–113.
- Goldberg, E.D., 1986.** The mussel watch concept. *Environ. Monit. Assess* 7, 91–103.
- Gonzalez-Doncel, M., de la Pena, E., Barrueco, C., Hinton, D.E., 2003.** Stage sensitivity of medaka (*Oryzias latipes*) eggs and embryos to permethrin. *Aquat. Toxicol.* 62, 255–268.
- Gonzalez-Doncel, M., Gonzalez, L., Fernandez-Torija, C., Navas, J.M., Tarazona, J.V., 2008.** Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 87, 280–288.
- Gonzalez-Doncel, M., Okihiro, M.S., Villalobos, S.A., Hinton, D.E., Tarazona, J.V., 2005.** A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrianichthyidae). *J. Appl. Ichthyol.* 21, 39–52.
- Gonzalez-Doncel, M., Villalobos, S.A., Okihiro, M.S., Hinton, D.E., 2004.** Does shaking alter the time of hatching in incubated medaka (*Oryzias latipes*) embryos? *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 364–370.
- Gonzalez, J.L., Chiffolleau, J.F., Miramand, P., Thouvenin, B., 1999.** Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire, Programme scientifique Seine Aval, Editions Ifremer, Plouzané, France, 31 p.
- Greco, L., Capri, E., Rustad, T., 2007.** Biochemical responses in *Salmo salar* muscle following exposure to ethynylestradiol and tributyltin. *Chemosphere* 68, 564–571.
- Grishchenkov, V.G., Townsend, R.T., McDonald, T.J., Autenrieth, R.L., Bonner, J.S., Boronin, A.M., 2000.** Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochem.* 35, 889–896.
- Guerra, R., 2012.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Polychlorinated Biphenyls and Trace Metals in Sediments from a Coastal Lagoon (Northern Adriatic, Italy). *Water, Air, Soil Pollut.* 223, 85–98.
- Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M.C., Soares, A.M.V.M., 1998.** Should the use of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers* 3, 157–163.

Gunn, A.M., Hunt, D.T.E., Winnard, D.A., 1989. The effect of heavy metal speciation in sediment on bioavailability to tubificid worms. *Hydrobiologia* 188/189, 487–496.

Guruge, K.S., Tanabe, S., 2001. Contamination by persistent organochlorine and Butyltin compounds in the west coast of Sri Lanka. *Mar. Pollut. Bull.* 43, 179–186.



Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, B., 1974. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.

Haib, J., Hofer, I., Renaud, J.-M., 2003. Analysis of multiple pesticide residues in tobacco using pressurized liquid extraction, automated solid-phase extraction clean-up and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1020, 173–187.

Hajji, F., Ouannes-Ghorbel, A., Ghorbel, M., Jarboui, O., 2013. Age and Growth of the Grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* Pallas, 1811 in the Gulf of Gabes (Tunisia, Central Mediterranean). *Acta Adriat.* 54, 27–40.

Hakk, H., Letcher, R.J., 2003. Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants. *Environ. Int.* 29, 801–828.

Hallare, A.V., Kosmehl, T., Schulze, T., Hollert, H., Köhler, H.R., Triebkorn, R., 2005. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Sci. Total Environ.* 347, 254–271.

Hamer, B., Jaksic, Z., Pavicic-Hamer, D., Perik, L., Medakovic, D., Ivankovic, D., Pavicic, J., Zilberberg, C., Schröed, H.C., Müller, W.E.G., Smoldaka, N., Batel, R., 2008. Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. *Aquat. Toxicol.* 89, 137–151.

Hamm, J.T., Hinton, D.E., 2000. The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon. *Aquat. Toxicol.* 48, 403–418.

Handayani, D., Edrada, R.A., Proksch, P., Wray, V., Witte, L., Van Soest, R.W.M., Kunzmann, A., Soedarsono, R., 1997. Four new bioactive polybrominated diphenyl ethers of the sponge *Dysidea herbacea* from West Sumatra, Indonésia. *J. nat. prod.* 60, 1313–1316.

- Harding, G.C., 1986.** Organochlorine dynamics between zooplankton and their environment, a reassessment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 33, 167–191.
- Harkey, G.A., Landrum, P.F., Klaine, S.J., 1994.** Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1315–1329.
- Harkey, G.A., Landrum, P.F., Vanhoof, P.L., 1995.** Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from a historically contaminated sediment core. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1551–1560.
- Harris, G.E., Metcalfe, T.L., Metcalfe, C.D., Huestis, S.Y., 1994.** Embryotoxicity of extracts from Lake Ontario rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1393–1403.
- Hartmann, P.C., Quinn, J.G., Cairns, R.W., King, J.W., 2004.** The distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in Narragansett Bay surface sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 351–358.
- Hartwig, A., 1998.** Carcinogenicity of metal compounds: Possible role of DNA repair inhibition. *Toxicol. Lett.* 102/103, 235–239.
- Harzallah, A., 2003.** Transport de polluants dans la lagune de Bizerte simulé par un modèle de circulation de l'eau. *Bull. Inst. Natl. Sci. Technol. Mer. Salammbô Tunisia* 30, 121–133.
- Hass, B.S., Brooks, E.E., Schumanne, K.E., Dornfeld, S.S., 1981.** Synergistic, additive, and antagonistic mutagenic responses to binary mixtures of benzo(a)pyrene and benzo(e)pyrene as detected by strains TA98 and TA100 in the Salmonella/microsome assay. *Environ. Mutagen.* 3, 159–166.
- Hasselberg, L., Meier, S., Svandal, A., Hegelund, T., Celander, M.C., 2004.** Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquat. Toxicol.* 67, 303–313.
- Hassine, S.B., Ameer, W.B., Gandoura, N., Driss, M.R., 2012.** Determination of chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls, and polybrominated diphenyl ethers in human milk from Bizerte (Tunisia) in 2010. *Chemosphere* 89, 369–377.
- Haufroid, V., Lison, D., 2005.** Mercapturic acids revisited as biomarkers of exposure to reactive chemicals in occupational toxicology: a minireview. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 78, 343–354.

- Haux, C., Forlin, L., 1988.** Biochemical methods for detecting effects of contaminants on fish. *Ambio*. 17, 376–380.
- Haynes, D., Johnson, J.E., 2000.** Organochlorine, heavy metal and polycyclic aromatic hydrocarbon pollutant concentrations in the great barrier reef (Australia) environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 41, 267–278.
- Hedfi, A., Mahmoudi, E., Beyrem, H., Boufahja, F., Essid, N., Aïssa, P., 2008.** Réponse d'une communauté de nématodes libres marins à une contamination par le cuivre: étude microcosmique. *Bull. Soc. Zoolog.* 133, 93–102.
- Hedfi, A., Mahmoudi, E., Boufahja, F., Beyrem, H., Aïssa, P., 2007.** Effects of increasing levels of nickel contamination on structure of offshore nematode communities in experimental microcosms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79, 345–349.
- Heintz, R.A., Short, J.W., Rice, S.D., 1999.** Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 494–503.
- Hendon, L.A., Carlson, E.A., Manning, S., Brouwer, M., 2008.** Molecular and developmental effects of exposure to pyrene in the early life-stages of *Cyprinodon variegatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol.* 147, 205–215.
- Hendy, E.J., Peake, B., 1996.** Organochlorine pesticides in a dated sediment core from Mapua, Waimea Inlet, New Zealand. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 751–754.
- Hickey, J.P., Batterman, S.A., Chernyak, S.M., 2006.** Trends of chlorinated organic contaminants in great lakes trout and walleye from 1970 to 1998. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 97–110.
- HIDROTECNICA PORTUGUESA, 1995.** Étude générale pour la protection du littoral tunisien contre l'érosion marine. Ministère de l'Équipement et de l'Habitat, Tunisie.
- Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F., 1994.** Guidance Document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the Workshop on Sediment Toxicity Assessment held at Slot Moermond Congresscentrum, Renesse, The Netherlands, 8-10 November 1993, Society of Environmental Toxicology and Chemistry - Europe, Brussels, 105 p.
- Hites, R.K., Day, H.R., 1992.** Unusual persistence of DDT in some Western USA soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 259–264.

- Hoarau, P., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., Girard, J.-P., 2001.** Differential induction of glutathione S-transferases in the clam *Ruditapes decussatus* exposed to organic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 523–529.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., 1984.** *Biochemical Adaptation* Princeton University Press, Princeton.
- Hodson, P.V., McWhirter, M., Ralph, K., Gray, B., Thivierge, D., Carey, J.H., van der Kraak, G., Whittle, D.M., Levesque, M.C., 1992.** Effects of bleached kraft mill effluent on fish in the St. Maurice river, Quebec. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1635–1651.
- Hoekstra, P.F., O'Hara T.M., Karlsson H., Solomon K.R., Muir D.C., 2003.** Enantiomerspecific biomagnification of alpha-hexachlorocyclohexane and selected chiral chlordane related compounds within an Arctic marine food web. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2482–2491.
- Hollert, H., Keiter, S., König, N., Rudolf, M., Ulrich, M., Braunbeck, T., 2003.** A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Soils Sediments* 3, 197–207.
- Holm, G., Norrgren, L., Andersson, T., Thuren, A., 1993.** Effects of exposure to food contamination with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Aquat. Toxicol.* 7, 33–50.
- Hong, S.H., Yim, U.H., Shim, W.J., Li, D.H., Oh, J.R., 2006.** Nationwide monitoring of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sediments from coastal environment of Korea. *Chemosphere* 64, 1479–1488.
- Hong, S.H., Yim, U.H., Shim, W.J., Oh, J.R., Lee, I.S., 2003.** Horizontal and vertical distribution of PCBs and chlorinated pesticides in sediments from Masan Bay, Korea. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 244–253.
- Hornung M.W., Spitsbergen J.M., Peterson, R.E., 1999.** 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters cardiovascular and craniofacial development and function in sac fry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Sci.* 47, 40–51.
- Hua, I., Kang, N., Jafvart, C.T., Fabrega-Duque, J.R., 2003.** Heterogenous photochemical reactions of decabromodiphenyl ether. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 798-804.
- Hu, N., Shi, X., Huang, P., Mao, J., Liu, J., Liu, Y., Ma, D., 2011.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of Liaodong Bay, Bohai Sea, China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 163–172.

Hung, C.C., Gong, G.C., Ko, F.C., Lee, H.J., Chen, H.Y., Wu, J.M., Hsu, M.L., Peng, S.C., Nan, F.H., Santschi, P.H., 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of the East China Sea and their relationship with carbonaceous materials. *Mar. Pollut. Bull.* 63, 464–470.

Hung, D.Q., Thiemann, W., 2002. Contamination by selected chlorinated pesticides in surface water in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere* 47, 357–367.



IARC, 1987. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IAPC monographs (Vol. 1–42). Lyon: International Agency for Research on Cancer. Suppl. 7.

ICES, 2008. Report of the Fourth ICES/OSPAR Workshop on Integrated Monitoring of Contaminants and their Effects in Coastal and Open Sea Areas (WKIMON IV). ICES, Copenhagen, Denmark. ICES CM 2008/ACOM: 49) 71 p.

Ikonomou, M.G., Rayne, S., Fischer, M., Fernandez, M.P., Cretney, W., 2002. Occurrence and congener profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental samples from coastal British Columbia, Canada. *Chemosphere* 46, 649–663.

Incardona, J.P., Carls, M.G., Teraoka, H., Sloan, C.A., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2005. Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ. Health Perspect.* 113, 1755–1762.

Incardona, J.P., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 191–205.

Incardona, J.P., Day, H.L., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2006. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217, 308–321.

INERIS, 2000. Evaluation du danger toxicologique de fioul rejeté sur les cotes.

- INERIS, 2003.** Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs). Évaluation de la relation dose-réponse pour des effets cancérigènes: Approche substance par substance (facteurs d'équivalence toxique -FET) et approche par mélanges - Évaluation de la relation dose-réponse pour des effets non cancérigènes: Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR). Rapport final (Doornaert, B., Pichard, A.,). <http://chimie.ineris.fr/fr/lespdf/haps.pdf>.
- INERIS, 2004.** Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques (Benzo(a)pyrène). <http://www-old.ineris.fr>.
- INERIS, 2005.** Polychlorobiphényles.
- INRS, 2007.** Biphényles Chlorés: Fiche Toxicologique. (Consulté le 13 févr. 2012). Disponible en ligne: <http://www.inrs.fr/>.
- INSTM, 2000.** Etat actuel et évolution de l'exploitation halieutique et aquacole des lagunes (Bizerte): 62 p.
- ISO, 1999.** Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test). Part 3: method using freeze-dried bacteria. European Standard ISO 11348-3:1998. Bruxelles: European Committee for Standardization.
- ISO, 1998.** Qualité de l'eau. Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema costatum* et *Phaedactylum tricornutum*. International Standards Organisation, Standard NF EN ISO10253: T90-311, 8p.
- Ivanov, V., Sandell, E., 1992.** Characterization of polychlorinated biphenyl isomers in sovol and trichlorodiphenyl formulations by high-resolution gas chromatography with electron capture detection and high-resolution gas chromatography-mass spectrometry techniques. Environ. Sci. Technol. 26, 2012–2017.
- Iwamatsu, T., 2004.** Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. Mech. Dev. 121, 605–618.
- Iwanowicz, L.R., Blazer, V.S., McCormick, S.D., VanVeld, P.A., Ottinger, C.A., 2009.** "Aroclor 1248 exposure leads to immunomodulation, decreased disease resistance and endocrine disruption in the brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*." Aquat. Toxicol. 93, 70–82.



- Jadal, M., El Yachoui, M., Bennasser, L., Fekhaoui, M., Foutlane, A., 2002.** Qualité des eaux de l'estuaire de l'oued Oum Erbia (Maroc) et influence de la dynamique marégraphique. *Eau l'ind. Nuis.* 256, 59–66.
- James, M.O., Kleinow, K.M., 1994.** Trophic transfert of chemicals in the aquatic environment. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K., (Eds.), *Molecular, biochemical and cellular perspectives*, Lewis, London, pp 69–92.
- Jeanneau, L., Faure, P., Montarges-Pelletier, E., Ramelli, M., 2006.** Impact of a highly contaminated river on a more important hydrologic system: Changes in organic markers. *Sci. Total Environ.* 372, 183–192.
- Jenkins, B.M., Jones, A.D., Turn, S.Q., Williams, R.B., 1996.** Emission factor for polycyclic aromatic hydrocarbons from biomass burning. *Environ. Sci. Technol.* 30, 2462–2469.
- Jiang, X., Xia, Z., Deng, L., Wei, W., Chen, J., Xu, J., Li, H., 2012.** Evaluation of accuracy for the measurement of octanol-water partition coefficient by MEEKC. *Chromatographia* 75, 347–352.
- Johnson, B.T., 1998.** Microtox[®] toxicity test system – new developments and applications. Pp. 201-218, In: Wells, P.G., Lee, K., Blaise, C., (Éds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Jorgenson, J.L., 2001.** Aldrin and dieldrin: A review of research on their production environmental deposition and fate, bioaccumulation, toxicology, and epidemiology in the United States. *Environ. Health. Perspect.* 109, 113–139.
- Juhasz, A.L., Naidu, R., 2000.** Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 45, 57–88.



- Kaaya, A., Najimi, S., Ribera, D., Narbonne, J.F., Moukrim, A., 1999.** Characterization of glutathione S-transferases (GST) activities in *Perna perna* and *Mytilus gallprovincialis* used as a biomarker of pollution in the Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 623–629.

- Kaiser, J., 2001.** Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment, Enfield: Sciences publishers inc. 204 p.
- Kallel, M.R., 1989.** Hydrologie du lac de Bizerte. Rapport, DRE (Direction des Ressources en Eau). Tunisie, 41 p.
- Kanally, R.A., Harayama, S., 2000.** Biodegradation of high-molecular-weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 2059–2067.
- Kanan, R., 2012.** Développements méthodologiques pour l'extraction et l'analyse des polluants organiques d'intérêt pour l'environnement marin: Application aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, France.
- Kannan, N., Reush, T.B.H., Schulz-Bull, D.E., Petrick, G., Duinker, J.C., 1995.** Chlorobiphenyls: model compounds for metabolism in food chain organisms and their potential use as ecotoxicological stress indicators by application of the metabolic slope concept. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1851–1859.
- Kanzari, F., Syakti, A.D., Asia, L., Malleret, L., Mille, G., Jamoussi, B., Abderrabba, M., Doumenq, P., 2012.** Aliphatic hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, organochlorine, and organophosphorous pesticides in surface sediments from the Arc river and the Berre lagoon, France. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 559–576.
- Karcher, W., 1988.** Spectral atlas of polycyclic aromatic compounds, Vol. 2. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp 16–18.
- Karcher, W., Devillers, J., Garrigues, P., Jacob, J., 1991.** Spectral atlas of polycyclic aromatic compounds. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p 21.
- Karickhoff, S., 1981.** Semiempirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere* 10, 833–846.
- Karmaus, W., Wolf, N., 1995.** Reduced birthweight and length in the offspring of females exposed to PCDFs, PCP, and lindane. *Environ. Health. Perspect.* 103, 1120–1125.
- Keddy, C., Greene, J.C., Bonnell, M.A., 1994.** A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment and freshwater in Canada. Environment Canada. Scientific Series No. 198.
- Keddy, C.J., Greene, J.C., Bonnell, M.A., 1995.** Review of whole-organism bioassays: Soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30, 221–251.

- Kelly, A.G., Campbell, L.A., 1995.** Persistent organochlorine contaminants in the Firth of Clyde in relation to sewage sludge input. *Mar. Environ. Res.* 41, 99–132.
- Kennicutt, M.C., Wade, T.L., Presley, B.J., Requejo, A.G., Brooks, J.M., Denoux, D.J., 1994.** Sediment contaminants in Casco Bay, Maine: inventories, sources, and potential for biological impact. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1–15.
- Kennish, M.J., 2002.** Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environ. Conserv.* 29, 78–107.
- Khan, I.A., Thomas, P., 2006.** "PCB congener-specific disruption of reproductive neuroendocrine function in Atlantic croaker." *Mar. Environ. Res.* 62, S25–S28.
- Khan, R.A., 2006.** Assessment of stress-related bioindicators in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) exposed to discharges from a pulp and paper mill in Newfoundland: a 5-year field study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 103–110.
- Khelil, F.Z., 2007.** Evaluation de la contamination bactérienne de l'eau de mer et d'un mollusque de moule *M. galloprovincialis* pêché du port d'Oran. 57 p.
- Khessiba, A., Hoarau, P., Gnassia-Barelli, M., Aïssa, P., Roméo, M., 2001.** Biochemical Response of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to Chemical Pollutant Exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 222–229.
- Khessiba, A., Roméo, M., Aïssa, P., 2005.** Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environ. Pollut.* 133, 275–281.
- Kim, K.S., Hirai, Y., Masunaga, S., Nakanishi, J., Urano, K., Kato, M., 2004.** Detailed PCB congener patterns in incinerator flue gas and commercial PCB formulations (Kanechlor). *Chemosphere* 55, 539–553.
- Kim, K.S., Lee, S.C., Kim, K.H., Shim, W.J., Hong, S.H., Choi, K.H., Yoon, J.H., Kim, J.G., 2009.** Survey on organochlorine pesticides, PCDD/Fs, dioxin-like PCBs and HCB in sediments from the Han River, Korea. *Chemosphere* 75, 580–587.
- Kim, Y., Cooper, K.R., 1998.** Interactions of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin (TCDD) and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) for producing lethal and sublethal effects in the Japanese medaka embryos and larvae. *Chemosphere* 36:406–418.
- Kim, Y., Cooper, K.R., 1999.** Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in the embryos and newly hatched larvae of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 39, 527–538.

- Klaasen, C.D., 1997.** Cassarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons, 5th ed. McGraw-Hill(ed).
- Knezovich, J.P., Harrison, F.L., Wilhelm, R.G., 1987.** The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: a review. *Water, Air, Soil Pollut.* 32, 233–245.
- Kopecka, J., Pempkowiak, J., 2008.** Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 379–391.
- Kopecka-Pilarczyk, J., 2013.** Comparison of selected biomarkers in flounder (*Platichthys flesus* L.) from the Douro (Portugal) and Vistula (Poland) River estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 37, 70–77.
- Kosmehl, T., Hallare, A.V., Braunbeck, T., Hollert, H., 2008.** DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Phillippines) as measured by the comet assay. *Mutat. Res: Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 650, 1–14.
- Kosmehl, T., Hallare, A.V., Reifferscheid, G., Manz, W., Braunbeck, T., Hollert, H., 2006.** A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2097–2106.
- Kramer, K.J.M., Botterweg, J., 1991.** Aquatic biological early warning systems : an overview. In: Jeffrey, D.W., Madden, B., (Eds.), « bioindicators and environmental management », Academic Press, London, pp 95–126.
- Krishna, K.R., Philip, L., 2009.** "Biodegradation of mixed pesticides by mixed pesticide enriched cultures." *J. Environ. Sci. Health, Part B: Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 44, 18–30.
- Kwon, T.D., Fisher, S.W., Kim, G.W., Hwang, H., Kim, J.E., 2006.** Trophic transfer and biotransformation of polychlorinated biphenyls in zebra mussel, round goby, and smallmouth bass in Lake Erie, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1068–1078.



Labrot, F.R.D., Tisnerat, G., Cabridenc, R., Narbonne, J.F., 1996. Le plomb dans l'environnement: sources, mécanismes de transfert et effets biologiques. Dans: "Aspects

- analytiques du plomb dans l'environnement". Coordonateur M. Morlot, Lavoisier Tec & Doc éditions, pp 3–15.
- Lacey, R., Watzin, M.C., Mc Intosh, A.W., 1999.** Sediment organic matter content as a confounding factor in toxicity tests with *Chironomus tentans*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 231–236.
- Lafon, D., Pichard, A., Bisson, M., 2000.** Évaluation du danger toxicologique du fioul rejeté sur les côtes. INERIS, Dossier ERIKA, Rapport 3. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, Verneuil-en-Halatte, France.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie: Principes et définitions. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F., (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie: Aspects fondamentaux*. Masson, Paris, pp 1–9.
- Lamberson, J.O., DeWitt, T.H., Swartz, R.C., 1992.** Assessment to Sediment Toxicity to Marine Benthos.
- Landrum, P.F., Lee, H., Lydy, M.J., 1992.** Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11, 1709–1725.
- Landrum, P.F., Robbins, J.A., 1990.** Bioavailability of sediment-associated contaminants to benthic invertebrates. In: Bando, R., Giesy, J.P.Jr., Muntau, H., (Eds.), *Chemistry And Toxicity of In-place Pollutants* Lewis Publishers, Inc, Ann Arbor. pp 237–263.
- Larsson, P., 1985.** Contaminated sediment of lakes and oceans act as sources of chlorinated hydrocarbons for release to water and atmosphere. *Nature* 317, 347–349.
- Lascourrèges-Berdeü, J.F., 1996.** Rôle des sulfatobactéries dans la remobilisation et la transformation des métaux et des composés organostanniques (butylétains et phénylétains) stockés dans les sédiments lagunaires. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux 1, France.
- Lavado, R., Ureña, R., Martin-Skilton, R., Torreblanca, A., Del Ramo, J., Raldúa, D., Porte, C., 2006.** The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environ. Pollut.* 139, 330–339.
- Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfrey, N., Casellas, C., Porcher, J.M., 2006.** Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology* 228, 98–108.
- Lawrence, A.J., Hemingway, K., 2003.** Effects of pollution on fish: Molecular effects and population responses, Wiley-Blackwell.

- Leaute, F., 2008.** Biogéochimie des contaminants organiques HAP, PCB et Pesticides organochlorés dans les sédiments de l'étang de Thau (France). Thèse de Doctorat, Université de Pierre et Marie Curie, France.
- Le Bihanic, F., Perrichon, P., Le Menach, K., Budzinski, H., Cousin, X., Cachot, J., 2014.** Development of a reference artificial sediment for chemical 1 testing adapted to the MELA sediment contact assay. (Article in press)
- Lee, G.F., Jones, R.A., 1982.** Discussion of article. Dredged material evaluations: correlations between chemical and biological evaluation procedures. J. Wat. Contr. Pollut. Fed. 54, 406–407.
- Lee, K.T., Tanabe, S., Koh, C.H., 2001.** Distribution of organochlorine pesticides in sediments from Kyeonggi Bay and nearby areas, Korea. Environ. Pollut. 114, 207–213.
- Lee, M.L., Novotny, M., Bartle, K.D., 1976.** Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne particulates. Anal. Chem. 48, 1566–1572.
- Lee, R.F., Keeran, W.S., Pickwell, G.V., 1988.** Marine invertebrate glutathione-S-transferase: purification, characterization and induction. Mar. Environ. Res. 24, 97–100.
- Lehtonen, K.K., Schiedek, D., Köhler, A., Lang, T., Vuorinen, P.J., Förlin, L., Baršienė, J., Pempkowiak, J., Gercken, J., 2006.** The BEEP project in the Baltic Sea: overview of results and outline for a regional biological effects monitoring strategy. Mar. Pollut. Bull. 53, 523–537.
- Lemaire, G., Terouanne, B., Mauvais, P., Michel, S., Rahmani, R., 2004.** Effect of organochlorine pesticides on human androgen receptor activation in vitro. Toxicol. Appl. Pharmacol. 196, 235–246.
- Letcher, R.J., Bustnes, J.O., Dietz, R., Jenssen, B.M., Jørgensen, E.H., Sonne, C., Verreault, J., Vijayan, M.M., Gabrielsen, G.W., 2010.** "Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish." Sci. Total Environ. 408, 2995–3043.
- Leveque, C., 1997.** Etat de santé des écosystèmes aquatiques: l'intérêt des variables biologiques. In séminaire national « Les variables biologiques : des indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques » Ministère de l'Environnement, 2-3 Novembre 1994, CEMAGREF (Eds.), pp 13–26.
- Levin, W., Buening, M.K., Wood, A.W., Chang, R.L., Kedzierski, B., Thakker, D.R., Boyd, D.R., Gadaginamath, G.S., Armstrong, R.N., Yagi, H., Karle, J.M., Slaga, T.J.,**

- Luch, A., Greim, H., Buturs, J.T.M., Mahadevan, B., Baird, W.M., Doehmer, J., Seidel, A., Glatt, H., 2002.** The role of cytochrome P4501B1 in dibenzo[a,l]pyrène-induced carcinogenesis. *Polycyclic Arom. Comp.* 22, 781–789.
- Libralato, G., Minetto, D., Totaro, S., Mičetić, I., Pigozzo, A., Sabbioni, E., Marcomini, A., Volpi Ghirardini, A., 2013.** Embryotoxicity of TiO₂ nanoparticles to *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). *Mar. Environ. Res.* 92, 71–78.
- Li, D., Lu, C., Wang, J., Hu, W., Cao, Z., Sun, D., Xia, H., Ma, X., 2009.** Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 91, 229–237.
- Lima, I., Moreira, S.M., Osten, J.R.-V., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2007.** Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere* 66, 1230–1242.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, A., 2003.** Endocrine disruptors in the environment, IUPAC technical report. *Pure. Appl. Chem.* 75, 631–681.
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., Pascariello, M.F., Marinosci, L., Schettino, T., 2003.** Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 324–330.
- Li, Q., Zhang, X., Yan, C., 2010.** Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination of recent sediments and marine organisms from Xiamen Bay, China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 711–721.
- Liu, Y., Ling, C.N., Zhao, J.F., Huang, Q.H., Zhu, Z.L., Gao, H.W., 2008.** Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of rivers and an estuary in Shanghai, China. *Environ. Pollut.* 154, 298–305.
- Livingstone, D.R., 1993.** Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57, 195–211.
- Livingstone, D.R., 2001.** Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- Livingstone, D.R., Archibald, S., Chipman, J.K., Marsh, J.W., 1992.** Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea, In: Stebbing, A.R.D. et al., (Eds.), *Biological effects of contaminants in the North Sea: Results of the ICES/IOC Bremerhaven Workshop*. Marine Ecology Progress Series 91, 97–104.

- Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L.D., Porte, C., Fitzpatrick, P.J., Förlin, L., Nasi, C., Fossato, V., Wootton, N., Goldfarb, P., 1995.** Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy: biochemical studies. *Mar. Environ. Res.* 39, 235–240.
- Livingstone, D.R., Nasi, C., 2000.** Biotransformation and antioxidant enzymes as potential biomarkers of contaminant exposure in goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. In: Lasserre, P., Marzollo, A., (Eds.), *The Venice Lagoon Ecosystem. Inputs and Interactions between Land and Sea*. UNESCO Paris and The Parthenon Publishing Group, Lancs and N.Y. Press, pp 357–373.
- Lobon-Cervia, J., Montaes, C., De Sostoa, A., 1991.** Influence of environment upon the life history of gudgeon, *Gobio gobio* (L.): a recent and successful colonizer of the Iberian Peninsular. *J. Fish Biol.* 39, 285–300.
- Long, E.R., 2000.** Degraded sediment quality in US estuaries: A review of magnitude and ecological implications. *Ecol. Appl.* 10, 338–350.
- Long, E.R., MacDonald, D.D., Smith, S.C., Calder, F.D., 1995.** Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Manage.* 19, 81–97.
- Long, E.R., Morgan, L.G., 1990.** The potential for biological effects of sediment-sorbed contaminants tested in the National Status and Trends Program. NOAA Technical Memorandum NOS OMA 52. NOAA Office of Oceanography and Marine Assessment, Seattle, 220 p.
- Long, E.R., Wilson, C.J., 1997.** On the identification of toxic hot spots using measures of the sediment quality triad. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 373–374.
- Looser, R., Ballschmiter, K., Hoyer, G.A., 1998.** Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) in freshwater fish. *Fresenius J. Anal. Chem.* 360, 816–819.
- Lopez-Barea, J., Pueyo, C., 1998.** Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutat. Res-Fund. Mol. M.* 399, 3–15.
- Loring, D.H., Rantala, R.T.T., 1992.** Manual for geochemical analysis of marine sediments and suspended particulate matter. *Earth Sci. Rev.* 32, 235–283.
- Louati, H., Said, O.B., Got, P., Soltani, A., Mahmoudi, E., Cravo-Laureau, C., Duran, R., Aissa, P., Pringault, O., 2013.** Microbial community responses to bioremediation

treatments for the mitigation of low-dose anthracene in marine coastal sediments of Bizerte lagoon (Tunisia). Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 300–310.

Louis I., 2010. Caractérisation d'outils diagnostiques pour la biosurveillance de l'environnement aquatique: Les poisons gobiidés de la lagune de Bizerte. Thèse de Doctorat, Université de Carthage, Tunis.

Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M.E., Ben-Attia, M., Menif, D., Bouchonnet, S., Porcher, J.M., Ben-Hassine, O.K., Aït-Aïssa, S., 2008. Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). Sci. Total Environ. 402, 318–329.

Luch, A., 2005. The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. London: Imperial College Press.

Lu, G.H., Wang, C., Zhu, Z., 2009. The dose–response relationships for EROD and GST induced by polyaromatic hydrocarbons in *Carassius auratus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 82, 194–199.

Lubet, P., 1959. Recherche sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit, 23 (4). 548 p.

Lubet, P., 1963. “Physiologie des moules”. Bull. Soc. Sci. Vét. Med. Comp. Lyon, 65, 1, pp 31–62.

Lubet, P., 1973. Exposé synoptique des données biologiques sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lmk., 1819). Synop. F.A.O. pêche 88 p.

Lubet, P., 1981. Action de la température sur le cycle de reproduction des lamellibranches. Extrait Bull. Soc. Zool. France, 106, 3, pp 283–291.

Lubet, P., Aloui, N., 1987. Limites létales thermiques et action de la température sur la gamétogénèse et l'activité neurosécrétoire chez la moule (*Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*), Mollusques bivalves. Haliotis, 16. pp 309–316.



MacDonald, C.R., Metcalfe, C.D., Metcalfe, T., Baltch, G.C., 1992. Temporal trends and distribution of PCB congeners in small contaminated lake in Ontario Canada. In: Gobas,

- F.A.P.C., McCorquodale, J.A., (Eds.), Chemical Dynamics in Freshwater Ecosystems. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 211–236.
- Macdonald, D.D., Carr, R.S., Calder, F.D., Long, E.R., Ingersoll, C.G., 1996.** Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology* 5, 253–278.
- Machala, M., Nezveda, K., Petřivalský, M., Běta Jarošová, A., Piačka, V., Svobodová, Z. 1997.** Monooxygenase activities in carp as biochemical markers of pollution by polycyclic and polyhalogenated aromatic hydrocarbons: Choice of substrates and effects of temperature, gender and capture stress. *Aquat. Toxicol.* 37, 113–123.
- Macias-Zamora, J.V., Mendoza-Vega, E., Villaescusa-Celaya, J.A., 2002.** PAHs composition of surface marine sediments: A comparison to potential local sources in Todos Santos Bay, B.C., Mexico. *Chemosphere* 46, 459–468.
- Macken, A., Giltrap, M., Foley, B., McGovern, E., McHugh, B., Davoren, M., 2008.** A model compound study: the ecotoxicological evaluation of five organic contaminants employing a battery of marine bioassays. *Environ. Pollut.* 153, 627–637.
- Mac, M.J., Edsall, C.C., 1991.** Environmental contaminants and the reproductive success of lake trout in the Great Lakes: An epidemiological approach. *J. Toxicol. Environ. Health* 33, 375–394.
- Mac, M.J., Edsall, C.C., Hesselberg, R.J., Sayers Jr, R.E., 1984.** Flow through bioassay for measuring bioaccumulation of toxic substances from sediment. US Environmental Protection Agency EPA-905/3-84-007. Washington, DC/EPA.
- MAERH, 2003.** Etude sur la dépollution industrielle dans le bassin versant du lac de Bizerte. Rapport, Ministère de l’Agriculture, de l’Environnement et des Ressources Hydrauliques, Tunis, 182 pp.
- Mages, M., Bandow, N., Kuster, E., Brack, W., von Tumpling, W., 2008.** Zinc and cadmium accumulation in single zebrafish (*Danio rerio*) embryos—a total reflection X-ray fluorescence spectrometry application. *Spectrochim. Acta Part B* 63, 1443–1449.
- Mahmoudi, E., Essid, E., Beyrem, H., Hedfi, A., Boufahja, F., Aïssa, P., 2007a.** Réponse d’une communauté de nématodes libres marins à une contamination par un métal lourd (le cobalt): étude microcosmique. *Bull. Soc. Zoolog. Fr.* 132, 111–123.
- Mahmoudi, E., Essid, E., Beyrem, H., Hedfi, A., Boufahja, F., Vitiello, P., Aïssa, P., 2007b.** Individual and combined effects of lead and zinc of a free living marine nematode community: results from microcosm experiments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 343, 217–226.

- Mahmoud, N., Dellali, M., Bour, M.E., Aissa, P., Mahmoudi, E., 2010.** The use of *Fulvia fragilis* (Mollusca: Cardiidae) in the biomonitoring of Bizerta lagoon: A mutimarkers approach. *Ecol. Indic.* 10, 696–702.
- Mai, B., Chen, S., Luo, X., Chen, L., Yang, Q., Sheng, G., Peng, P., Fu, J., Zeng, E.Y., 2005.** Distribution of polybrominated diphenyl ethers in sediments of the Pearl River Delta and adjacent South China Sea. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3521–3527.
- Malavasi, S., Coppola, J., Pranovi, F., Granzotto, A., Franco, A., Torricelli, P., 2002.** Habitat riproduttivo di *Zosterisessor ophiocephalus* Pall. (Pisces, Gobiidae) in laguna di Venezia e osservazioni sulle caratteristiche dei riproduttori. *Societa Veneziana di Scienze Naturali Lavori* 27, 47–56.
- Malmvärn, A., Marsh, G., Kautsky, L., Athanasiadou, M., Bergman, A., Asplund, L., 2005.** Hydroxylated and methoxylated brominated diphenyl ethers in the red algae *Ceramium tenuicorne* and blue mussels from the Baltic Sea. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2990–2997.
- Manchester-Neesvig, J.B., Valters, K., Sonzogni, W.C., 2001.** Comparison of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in lake Michigan salmonids. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1072–1077.
- Manoli, E., Samara, C., Konstantinou, I., Albanis, T., 2000.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bulk precipitation and surface waters of Northern Greece. *Chemosphere* 41, 1845–1855.
- Mansouri, T., 1996.** Application de la télédétection et des systèmes d'information géographiques à l'étude du fonctionnement hydrologique du lac de Bizerte et de son bassin versant. D. E. A. Fac. Sc. Tunis, 101 p.
- Mansour, M., Mamouni, A., Meallier, P., 1988.** "Factors determining the behaviour and transformation of selected pesticides in water, soil suspension and soil." Methodological aspects of the study of pesticide behaviour in soil. Versailles, pp 87–100.
- Marie, C., 2007.** Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier – Grenoble I, France.
- Marty, G.D., Cech Jr., J.J., Hinton, D.E., 1990.** Effect of incubation temperature on oxygen consumption and ammonia production by Japanese medaka, *Oryzias latipes*, eggs and newly hatched larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1397–1403.

- Masclet, P., Nikolau, K., Mouvier, G., 1984.** Identification des sources d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques particulières dans l'atmosphère urbaine. In physico-chemical behavior of atmospheric pollutant. Proceeding of the third European Symposium held in Varese Italy, pp 616–626.
- Ma, T.-H., Sandhu, S.S., Chene, T.D., Kim, T.-W., 1991.** Synergism and antagonism of genotoxic effects among the chemicals commonly found in the hazardous waste sites. Dans: 2 2nd Annual Scientific Meeting o f the Environmental Mutagen Society, Kissimmee, Florida, USA. Environ.Mol. Mutagen. Suppl. 0(19), 45–46.
- Matozzo, V., Tomei, A., Marin, M.G., 2005.** Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. Mar. Pollut. Bull. 50, 1686–1693.
- Matthiessen, P., Bifield, S., Jarrett, F., Kirby, M.F., Law, R.J., McWinn, W.R., Sheahan, D.A., Thain, J.E., Whale, G.R., 1998.** An assessment of sediment toxicity in the River Tyne Estuary, U.K. by means of bioassays. Mar. Environ. Res. 45, 1–15.
- Mattina, M.J., Iannucci-Berger, W., Dykas, L., 2000.** Chlordane uptake and its translocation in food crops. J. Agric. Food. Chem. 48, 1909–1915.
- Mayer, F.L., Verteeg, D.J., McKee, M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C., Rattner, B.A., 1992.** Physiological and non-specific biomarkers. In: Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (Eds.), Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, Michigan, pp 5–87.
- Mazeas, O., 2004.** Evaluation de l'exposition des organismes aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans le milieu marin par le dosage des métabolites de HAP. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, Talence, France, 456 pp.
- McCarthy, J.F., Shugart, L.R., 1990.** Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publisher, Boca Raton, FL, pp 3–16.
- McCauley, D.J., DeGraeve, G.M., Linton, T.K., 2000.** Sediment quality guidelines and assessment: overview and research needs. Environ. Sci. Policy 3, 133–144.
- McCready, S., Spyarakis, G., Greely, C.R., Birch, G.F., Long, E.R., 2004.** Toxicity of surficial sediments from Sydney Harbour and vicinity, Australia. Environ. Monit. Assess. 96, 53–83.

- McCarthy, I.D., Fuiman, L.A., Alvarez, M.C., 2003.** "Aroclor 1254 affects growth and survival skills of Atlantic croaker *Micropogonias undulatus* larvae." *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 252, 295–301.
- MacDonald, D.D., Dipinto, L.M., Field, J., Ingersoll, C.G., Long, E.R., Swartz, R.C., 2000.** Development and evaluation of consensus-based sediment effect concentrations for polychlorinated biphenyls. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1403–1413.
- McDonald, J.H., Seed, R., Koehn, R.K., 1991.** Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern Hemispheres. *Mar. Biol.* 111, 323–333.
- McElroy, A.E., Bogler, A., Weisbaum, D., Norris, M., Mendelman, L.V., Setlow, R., Winn, R., 2006.** Uptake, metabolism, mutant frequencies and mutational spectra in [λ] transgenic medaka embryos exposed to benzo[a]pyrene dosed sediments. *Mar. Environ. Res.* 62, S273–S277.
- McElroy, A.E., Farrington, J.W., Teal, J.M., 1989.** Bioavailability of PAH in the aquatic environment. In: Varanasi, U., (EdS), *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1–40.
- McElroy, A.E., Sisson, J.D., 1989.** Trophic transfer of benzo[a]pyrene metabolites between benthic marine organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 28, 265–269.
- Meador, J.P., Ross, B.D., Dinnel, P.A., Piquelle, S.J., 1990.** An analysis of the relationship between a sanddollar embryo elutriate assay and sediment contaminants from stations in an urban embayment of Puget Sound, Washington. *Mar. Environ. Res.* 30, 251–272.
- Means, J.C., Wood, S.G., Hassett, J.J., Banward, W.L., 1980.** Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* 14, 1524–1528.
- Medeiros, P.M., Caruso Bicego, M., Menezes Castelao, R., Del Rosso, C., Fillmann, G., Josemar Zamboni, A., 2005.** Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environ. Int.* 31, 77–87.
- Menif, D., 2000.** Les gobiidés des côtes tunisiennes : Morphologie et Biologie de *Zosterisessor ophiocephalus* (pallas, 1811) et *Gobius niger* Linnaeus 1758. Thèse de doctorat, Fac. Sc. Math. Phys. et Nat. de Tunis.
- Mersch-Sundermann, V., Mochayed, S., Kevekordes, S., 1992.** Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutat. Res.* 278, 1–9.
- Metcalf, R.L., 1973.** A century of DDT. *J. Agr. Food Chem.* 21, 511–520.

- Mhadhbi, L., Boumaiza, M., Beiras, R., 2010.** A standard ecotoxicological bioassay using early life stages of the marine fish *Psetta maxima*. *Aquat. Living Resour.* 23, 209–216.
- Mhiri, C., de Marsac, N.T., 1997.** Réhabilitation par les microorganismes de sites contenant du pyralène: problématique et perspectives d'étude. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 95, 3–28.
- Miège, C., Dugay, J., Hennion, M.C., 1999.** Méthodes de caractérisation des HPA et des PCB dans les boues résiduelles de stations d'épuration. n°3359. Editions ADEME, Angers.
- Miller, B.S., Pine, D.J., Redshaw, J., 2000.** An assessment of the contamination and toxicity of marine sediments in the Holy Loch, Scotland. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 22–34.
- Miller, E.C., Miller, J.A., 1981.** Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*, 47, 2327–2345.
- Miller, P.J., 1986.** Gobiidae. In: Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Nielsen, J., Tortonese, E., (Eds.), *Fishes of the Northeastern Atlantic and the Mediterranean*. Paris: UNESCO. 3, 1019–1085.
- Minh, N.H., Someya, M., Minh, T.B., Kunisue, T., Iwata, H., Watanabe, M., Tanabe, S., Viet, P.H., Tuyen, B.C., 2004.** Persistent organochlorine residues in human breast milk from Hanoi and Hochiminh City, Vietnam: contamination, accumulation kinetics and risk assessment for infants. *Environ. Pollut.* 129, 431–441.
- Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquene, G., Godefroy, D., Burgeot, T., Leboulenger, F., 2000.** Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Mar. Environ. Res.* 50, 373–377.
- Miquel, M., 2001.** Les effets des métaux lourds sur l'Environnement et la Santé. Rapport office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Rapport Sénat N°261 : 360 p.
- Monirith, I., Ueno, D., Takahashi, S., Nakata, H., Sudaryanto, A., Subramanian, A., Karuppiyah, S., Ismail, A., Muchtar, M., Zheng, J., Richardson, B.J., Prudente, M., Hue, N.D., Tana, T.S., Tkalin, A.V., Tanabe, S., 2003.** Asia-Pacific mussel watch: monitoring contamination of persistent organochlorine compounds in coastal waters of Asian countries. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 281–300.
- Monod, G., Devaux, A., Riviere, J.L., 1988.** Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhône. *Sci. Total. Environ.* 73, 189–201.
- Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A.,**

2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Phys. C.* 146, 221–234.
- Monteiro, D.A., de Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L. 2006.** Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 143, 141–149.
- Montero, N., Belzunce-Segarra, M.J., Menchaca, I., Garmendia, J.M., Franco J., Nieto, O., Etxebarria, N., 2013.** Integrative sediment assessment at Atlantic Spanish harbours by means of chemical and ecotoxicological tools. *Environ. Monit. Assess.* 185, 1305–1318.
- Montone, R.C., Taniguchi, S., Weber, R.R., 2001.** Polychlorinated biphenyls in marine sediments of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 611–614.
- Moon, H.-B., Kannan, K., Lee, S.-J., Choi, M., 2007.** Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sediment and bivalves from Korean coastal waters. *Chemosphere* 66, 243–251.
- Mora, P., Michel, X., Narbonne, J.-F., 1999.** Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environ. Toxicol. Phar.* 7, 253–260.
- Moreira, S.M., Guilhermino, L., 2005.** The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the Northwest Portuguese Coast. *Environ. Monit. Assess.* 105, 309–325.
- Mostafa, A.R., Wade, T.L., Sweet, S.T., Al-Alimi, A.K.A., Barakat, A.O., 2007.** Assessment of persistent organochlorine residues in sediments of Hadramout coastal area, Gulf of Aden, Yemen. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1053–1058.
- Mostafa, A.R., Wade, T.L., Sweet, S.T., Al-Alimi, A.K.A., Barakat, A.O., 2009.** Distribution and characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of Hadhramout coastal area, Gulf of Aden, Yemen. *J. Mar. Syst.* 78, 1–8.
- Mouldi, B., Bejaoui, B., Atoui, A., 2008.** Etude de l'hydrodynamique sédimentaire de la lagune de Bizerte. *Bull. Inst. Natl. Sci. Technol. Mer. Salammbô Tunisia* 35, 149–160.
- Mourgaud, Y., Martinez, E., Geffard, A., Andral, B., Stanisiere, J.Y., Amiard, J.C., 2002.** Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers* 7, 479–490.
- Moyle, P.B., Cech, J.J., 2004.** *Fishes, an introduction to ichthyology*. 5th edition Upper Saddle River: Prentice-Hall, 726 p.

- MPO, 2003.** Direction des politiques et des services économiques, Région du Golfe, « Profil de la moule bleue (*Mytilus edulis*) », pêche et Océans Canada., 59 p.
- Müller, A., Björklund, E., Von Holst, C., 2001.** On-line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedingstuffs and food matrices using gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 925, 197–205.
- Mzoughi, N., Chouba, L., 2012.** Heavy Metals and PAH Assessment Based on Mussel Caging in the North Coast of Tunisia (Mediterranean Sea). *Int. J. Environ. Res.* 6, 109–118.
- Mzoughi, N., Hellal, F., Dachraoui, M., Villeneuve, J.P., Cattini, C., de Mora, S.J., El Abed, A., 2002.** Méthodologie de l'extraction des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Application à des sédiments de la lagune de Bizerte (Tunisie). *C. R. Geosci.* 334, 893–901.
- Mzoughi, N., Lespes, G., Bravo, M., Dachraoui, M., Potin-Gautier, M., 2005.** Organotin speciation in Bizerte lagoon (Tunisia). *Sci. Total Environ.* 349, 211–222.



- Näf, C., Broman, D., Pettersen, H., Rolff, C., Zebühr, Y., 1992.** Flux estimates and pattern recognition of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in the waters outside various emission sources on the Swedish Baltic coast. *Environ. Sci. Technol.* 26, 1444–1457.
- Nakayama, K., Oshima, Y., Nagafuchi, K., Hano, T., Shimasaki, Y., Honjo, T., 2005.** Early-life-stage toxicity in offspring from exposed parent medaka, *Oryzias latipes*, to mixtures of tributyltin and polychlorinated biphenyls. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 591–596.
- Narahashi, T., 1992.** Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. *Trends. Pharmacol. Sci.* 13, 236–241.
- Narbonne, J.F., 1998.** Historique-fondements biologiques de l'utilisation de biomarqueurs en écotoxicologie. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., (Eds.), « Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement », Tec et Doc Lavoisier, Paris, pp 1–7.

- Narbonne, J.F., Aarab, N., Clérandeau, C., Daubèze, M., Narbonne, J., Champeau, O., Garrigues, P., 2005.** Scale of classification based on biochemical markers in mussels: Application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. *Biomarkers* 10, 58–71.
- Narbonne, J.F., Djomo, J.E., Ribera, D., Ferrier, V., Garrigues, P., 1999.** Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42, 1–8.
- Narro, M.L., Cerniglia, C.E., Van Baalen, C., Gibson, D.T., 1992.** Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* pr-6. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1351–1359.
- Naso, B., Perrone, D., Ferrante, M.C., Bilancione, M., Lucisano, A., 2005.** Persistent organic pollutants in edible marine species from the Gulf of Naples, Southern Italy. *Sci. Total Environ.* 343, 83–95.
- Neff, J.M., 1985.** Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (Eds.), *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA., pp 416–454.
- Nendza, M., 2002.** Inventory of marine biotest methods for the evaluation of dredged material and sediments. *Chemosphere* 48, 865–883.
- Nesto, N., Romano, S., Moschino, V., Mauri, M., Da Ros, L., 2007.** Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. *Mar. Pollut. Bull.* 55, 469–484.
- N'guessan, Y.M., 2008.** Dynamique des éléments traces dans les eaux de surface des bassins versants agricoles de Gascogne. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France.
- Nhan, D.D., Carvalho, F.P., Am, N.M., Tuan, N.Q., Yen, N.T.H., Villeneuve, J.P., Cattini, C., 2001.** Chlorinated pesticides and PCBs in sediments and molluscs from freshwater canals in the Hanoi region. *Environ. Pollut.* 112, 311–320.
- Nipper, M., Carr, R.S., Biedenbach, J.M., Hooten, R.L., Miller, K., 2002.** Toxicological and chemical assessment of ordnance compounds in marine sediments and porewaters. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 789–806.
- Nirmala, K., Oshima, Y., Lee, R., Imada, N., Honjo, T., Kobayashi, K., 1999.** Transgenerational toxicity of tributyltin and its combined effects with polychlorinated biphenyls on reproductive processes in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 717–721.

- Nisbet, C., LaGoy, P., 1992.** Toxic Equivalency Factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 16, 290–300.
- NIST, 2002.** Document internet, <http://ois.nist.gov/pah>.
- Norstrom, R.J., Letcher, R.J., 1996.** Role of biotransformation in bioconcentration and bioaccumulation. Annex I in *Biotransformation in environmental risk assesment. a SETAC Workshop Noordwijkerhout, the Netherlands.* Sijm, De Bruijn, De voogt et De wolf (eds). 28 April-May 1996.
- NRC, 1983.** Polycyclic aromatic hydrocarbons: evaluation of sources and effects. Washington, DC: National Academy Press.
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M., 1988.** Quantitative assessment of world-wide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134–139.
- Núñez, O., Moyano, E., Galceran, M.T., 2005.** LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 24, 683–703.



- Oakes, K.D., Van Der Kraak, G.J., 2003.** Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 63, 447–463.
- OCDE, 1987.** Utilisation des tests biologiques pour l'évaluation et le contrôle de la pollution de l'eau, monographies sur l'environnement n° 11, OCDE.
- OCDE, 1992a.** Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organization for Economic Cooperation and Development. 9 p.
- OCDE, 1992b.** Section 2: Effects on Biotic systems test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, pp 1–18.
- OCDE, 1998.** Section 2: Effects on Biotic systems test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, pp 1–20.
- Offenberg, J.H., Naumova, Y.Y., Turpin, B.J., Eisenreich, S.J., Morandi, M.T., Stock, T., Colome, S.D., Winer, A.M., Spektor, D.M., Zhang, J., Weisel, C.P., 2004.**

- Chlordanes in the indoor and outdoor air of three U.S. cities. Environ. Sci. Technol. 38, 2760–2768.
- Ohta, T., Nakamura, N., Moriya, M., Shirasu, Y., Kada, T., 1984.** The SOS function-inducing activity of chemical mutagens in *Escherichia coli*. Mutat. Res. 131, 101–109.
- Ojanguren, A.F., Reyes-Gavilan, F.G., Munoz, R.R., 1999.** Effects of temperature on growth and efficiency of yolk utilization in eggs and pre-feeding stages of Atlantic salmon. Aquacult. Int. 7, 81–87.
- Olesen, T.M.E. Weeks, J.M., 1994.** Accumulation of cd by the marine sponge *Halichondria panacea* pallas: effects upon filtration rate and its relevance for biomonitoring. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 52, 722–728.
- ONAS, 2001.** Base de données CADRIN « ONAS », Cadastre des activités industrielles dans le gouvernorat de Bizerte.
- Oris, J.T., Giesy, J.P., 1987.** The photo-induced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to larvae of the fathead minnow. Chemosphere 16, 1395–1404.
- Örn, S., Andersson, P.L., Förlin, L., Tysklind, M., Norrgren, L., 1998.** "The impact on reproduction of an orally administered mixture of selected PCBs in zebrafish (*Danio rerio*).". Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 52–57.
- Oshima, Y., Kang, I.J., Kobayashi, M., Nakayama, K., Imada, N., Honjo, T., 2003.** Suppression of sexual behavior in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17-estradiol. Chemosphere 50, 429–436.
- OSPAR, 2000.** Quality Status Report: Region IV – Bay of Biscay and Iberian Coast. OSPAR Commission, London.
- Otto, D.M.E., Moon, T.W., 1996.** Phases I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31, 141–147.
- Ouakad, M., 1993.** Caractères sédimentologiques et géochimiques des dépôts superficiels de la lagune de Bizerte (Tunisie septentrionale). In: circulation des eaux et pollution des côtes méditerranéennes des pays du maghreb. Edition INOC, Izmir, Turquie, pp 187–194.



- Pacheco, M., Santos, M.A., 2002.** Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 331–347.
- PAHs position paper, 2001.** Ambient air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Office for Official Publication of the European Communities, Luxembourg.
- Pandit, G.G., Sahu, S.K., Sadasivan, S., 2002.** Distribution of HCH and DDT in the coastal marine environment of Mumbai, India. *J. Environ. Monit.* 4, 431–434.
- Pardos, M., Benninghoff, C., Thomas, R.L., Khim-Heang, S., 1999.** Confirmation of elemental sulfur toxicity in the Microtox assay during organic extract assessment of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 188–193.
- Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J.B., Beiras, R. 2013.** Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Siriella armata*. (Article in Press).
- Parolini, M., Binelli, A., Matozzo, V., Marin, M.G., 2010.** Persistent organic pollutants in sediments from the Lagoon of Venice—a possible hazard for sediment-dwelling organisms. *J. Soil Sediment* 10, 1362–1379.
- Parolini, M., Pedriali, A., Binelli, A., 2013.** Chemical and biomarker responses for site-specific quality assessment of the Lake Maggiore (Northern Italy). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 5545–5557.
- Patyna, P.J., Davi, R.A., Parketon, T.F., Brown, R.P., Cooper, K.R., 1999.** A proposed multigeneration protocol for Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate endocrine disruptors. *Sci. Total Environ.* 233, 211–220.
- Payne, J.F., Fancey, L.L., Rahimtula, A.D., Porter, E.L., 1987.** Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86, 233–245.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L., 1996.** Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 225–231.

- Peakall, D., 1992.** Animal Biomarkers as Pollution Indicators. Ecotoxicol. Series 1. Chapman and Hall, London, 291 p.
- Peakall, D.B., Shugart, L.R., 1993.** Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health. NATO ASI Series, Ser H: Cell Biology, Vol 68. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Pearlman, R.S., Yalkowsky, S.H., Banerjee, S., 1984.** Water solubility of polynuclear aromatic and heteroaromatic compounds. J. Phys. Chem. Ref. Data 13, 555–562.
- Pearson, C.R., 1982.** Halogenated Aromatics. The Handbook of Environmental Chemistry Volume 3 / 3B, 1982, pp 89–116.
- Pedersen, T.F., 1995.** Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis a comment. Mar. Chem. 49, 117–119.
- Peebua, P., Kosiyachinda, P., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., 2007.** Evaluation of alachlor herbicide impacts on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using biochemical biomarkers. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 78, 138–141.
- Peltonen, K., Dipple, A., 1995.** Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry of DNA adduct formation. J. Occup. Environ. Med. 37, 52–58.
- Pereira, W.E., Hostettler, F.D., Rapp, J.B., 1996.** Distributions and fate of chlorinated pesticides, biomarkers and polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments along a contamination gradient from a point source in San Francisco Bay, California. Mar. Environ. Res. 41, 299–314.
- Perez-Ruzafa, A., Navarro, S., Barba, A., Marcos, C., Camara, M.A., Salas, F., Gutierrez, J.M., 2000.** Presence of pesticides throughout trophic compartments of the food web in the Mar Menor lagoon (SE Spain). Mar. Poll. Bull. 40, 140–151.
- Perra, G., Pozo, K., Guerranti, C., Lazzeri, D., Volpi, V., Corsolini, S., Focardi, S., 2011.** Levels and spatial distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in superficial sediment from 15 Italian marine protected areas (MPA). Mar. Pollut. Bull. 62, 874–877.
- Peters, C.A., Knightes, C.D., Brown, D.G., 1999.** Long-term composition dynamics of PAH-containing NAPLs and implications for risk assessment. Environ. Sci. Technol. 33, 4499–4507.
- Pfeifer, S., Schiedek, D., Dippner, J.W., 2005.** Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus sp.* from the south-western Baltic Sea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 320, 93–103.
- Phillips, D.H., 1999.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. Mutat. Res. 443, 139–147.

- Phillips, D.J.H., Rainbow, P.S., 1994.** Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants, second ed. Chapman & Hall, London.
- Piazza, R., Ruiz-Fernández, A. C., Frignani, M., Zangrando, R., Bellucci, L. G., Moret, I., Páez-Osuna, F., 2008.** PCBs and PAHs in surficial sediments from aquatic environments of Mexico City and the coastal states of Sonora, Sinaloa, Oaxaca and Veracruz (Mexico). *Environ. Geol.* 54, 1537–1545.
- Pichard, A., Bisson, M., Gay, G., Houeix, N., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Magaud, H., Migne, V., Morin, A., Tissot, S., 2006.** Cobalt et ses dérivés. Rapport, pp 1–55.
- Picot, A., 1983.** La recherche. 14, 1584–1587.
- Pietzsch, R., Patchineelam, S.R., Torres, J.P.M., 2010.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments from a subtropical estuary in Brazil. *Mar. Chem.* 118, 56–66.
- PNUE, 2010.** Les inventaires des PCB, le point de départ. *PEN magazine*; 1^{er} numéro (Consulté le 11 mars 2012). Disponible en ligne: <http://chm.pops.int/Implementation/PCBs/PCBsEliminationNetworkPEN/PENmagazine/tabid/738/Default.aspx#LiveContent> [PENmag].
- Pompella, A., Maelloaro, E., Casini, A.A., Farrali, M., Ciccoli, J.M., 1987.** Measurement of lipid peroxydation in vivo: a comparaison of different procedures. *Lipids*, 22, 206–211.
- Porte, C., Biosca, X., Pastor, D., Solé, M., Albaigés, J., 2000.** The Aegean Sea oil spill. 2. Temporal study of the hydrocarbons accumulation in Bivalves. *Environ. Sci. Technol.* 34, 5067–5075.
- Power, E.A., Munkittrick, K.P., Chapman, P.M., 1991.** An ecological impact assessment framework for decision making related to sediment quality. In: Mayes, M.A., Barron, G.M., (Eds.), *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*. ASTM STP 1124, Philadelphia. 14, 48–64.
- Prevodnik, A., Gardeström, J., Lilja, K., Elfving, T., McDonagh, B., Petrovic, N., Tedengren, M., Sheehan, D., Bollner, T., 2007.** Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea. *Aquat. Toxicol.* 82, 63–71.
- Provost, D., Cantagrel, A., Lebailly, P., Jaffre, A., Loyant, V., Loiseau, H., Vital, A., Brochard, P., Baldi, I., 2007.** Brain tumours and exposure to pesticides: a casecontrol study in southwestern France. *Occup. Environ. Med.* 64, 509–514.

Prygiel, J., Rosso-Darmet, A., Lafont, M., Lesniak, C., Durbec, A., Ouddane, B., 1999.

Use of oligochaete communities for assessment of ecotoxicological risk in fine sediment of rivers and canals of the Artois-Picardie water basin (France). *Hydrobiologia* 410, 25–37.

Pyle, G.G., Rajotte, J.W., Couture, P., 2005. Effects of industrial metals on wild fish

populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 287–312.



Qiao, M., Wang, C.X., Huang, S.B., Wang, D.H., Wang, Z.J., 2006. Composition, sources,

and potential toxicological significance of PAHs in the surface sediments of Meiliang Bay,

Taihu Lake, China. *Environ. Int.* 32, 28–33.

Quan, X., Tang, Q., He, M., Yang, Z., Lin, C., Guo, W., 2009. Biodegradation of

polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Daliao river watershed. China. *J.*

Environ. Sci. 21, 865–871.

Quensen III, J.F., Tiedje, J.M., Boyd, S.A., 1988. Reductive dechlorination of

polychlorinated biphenyls by anaerobic micro-organisms from sediments. *Science* 242,

752–754.

Quillardet, P., Hofnung, M. 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for

genotoxins: procedures. *Mutat. Res.* 147, 65–78.

Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R., Hofnung, M., 1982. SOS Chromotest, a direct

assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5971–5975.

Quiroz, R., Grimalt, J.O., Fernández, P., 2010. Toxicity assessment of polycyclic aromatic

hydrocarbons in sediments from European high mountain lakes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*

73, 559–564.

Qureshi, A.A., Bulich, A.A., Isenberg, D.L., 1998. Microtox[®] toxicity test systems – Where


they stand today. In: *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Techniques, Advances,*

and Practice. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 185–200.



- Rahman, F., Langford, H.K., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2001.** Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *The Science of the Total Environment*, 275, 1–17.
- Rajendran, R.B., Imagawa, T., Tao, H., Ramesh, R., 2005.** Distribution of PCBs, HCHs and DDTs, and their ecotoxicological implications in Bay of Bengal, India. *Environ. Int.* 31, 503–512.
- Ramade, F., 1992.** Précis d'écotoxicologie, Paris.
- Ramade, F., 1998.** Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau: biogéochimie et écologie des eaux continentales et littorales. Ediscience international, Paris, 786 p.
- Ramade, F., Papigny, A.-G., 2000.** Dictionnaire encyclopédique des pollutions: les polluants de l'environnement à l'homme. Paris: Ediscience international. 690 p.
- Ramos-Gómez, J., Coz, A., Viguri, J.R., Luque, A., Martín-Díaz, M.L., DelValls, T.A., 2011.** Biomarker responsiveness in different tissues of caged *Ruditapes philippinarum* and its use within an integrated sediment quality assessment. *Environ. Pollut.* 159, 1914–1922.
- Rand, G.M., Wells, P.G., McCarthy, L.S., 1995.** Introduction to Aquatic Toxicology. In: Rand, G.M., (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*, Taylor et Francis, Etats-Unis.
- Rantamaki, P., 1997.** Release and Retention of selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) And their methylated derivatives by the common mussel (*Mytilus edulis*) in the brackish water of the Baltic sea. *Chemosphere* 35, 487–502.
- Rao, J.V., Kavitha, P., Srikanth, K., Usman, P.K. et Rao, T.G., 2007.** Environmental contamination using accumulation of metals in marine sponges, *Sigmadocia fibulata* inhabiting the coastal waters of Gulf of Mannar, India. *Toxicol. Environ. Chem.* 89, 487–498.
- Regoli, F., 1998.** Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 48–63.
- Regoli, F., Hummel, H., Amiard-Triquet, C., Larroux, C., Sukhotin, A., 1998.** Trace metals and variations of antioxidant enzymes in Arctic bivalve populations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 594–601.

- Regoli, F., Principato, G., 1995.** Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143–164.
- Reynaud, S., Deschaux, P., 2006.** The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquat. Toxicol.* 77, 229–238.
- Rhodes, S., Farwell, A., Hewitt, L.M., MacKinnon, M., Dixon, D.G., 2005.** The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 247–258.
- Ribeyre, F., Boudou, A., 1989.** Trophic chains and experimental ecosystems: study of bioaccumulation and transfer processes. In: Boudou, A., Ribeyre, R., (Eds.). *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies*, CRC Press, Boca Raton, FL. 1, 3–46.
- Richman, L.A., Kolic, T., MacPherson, K., Fayez, L., Reiner, E., 2013.** Polybrominated diphenyl ethers in sediment and caged mussels (*Elliptio complanata*) deployed in the Niagara River. *Chemosphere* 92, 778–786.
- Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M.H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., Andre, V., Lebailly, P., Cachot, J., 2006.** Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquat. Toxicol.* 79, 65–77.
- Rocher, V., 2003.** Introduction et stockage des hydrocarbures et des éléments métalliques dans le réseau d'assainissement unitaire parisien. Thèse de Doctorat, Université Paris XII - Val de Marne, France.
- Rocher, V., Azimi, S., Moilleron, R., Chebbo, G., 2004.** Hydrocarbons and heavy metals in the different sewer deposits in the Le Marais' catchment (Paris, France): stocks, distributions and origins. *Sci. Total Environ.* 323, 107–122.
- Rocher, V., Moilleron, R., 2007.** Identification des sources d'hydrocarbures en milieu urbain: approche automatisée. http://www.sisyphe.jussieu.fr/internet/piren/rapports/archives/2000/Theme_5/th5_rocher.pdf. Site consulté le: 12 février 2007.
- Rodriguez-Ariza, A., Martinez-Lara, E., Pascual, P., Pedrajas, J.R., Abril, N., Dorado, G., Toribio, F., Barcena, J.A., Peinado, J., Pueyo, C., Lopez-Barea, J., 1993.**

- Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Sci. Total Environ.* 134, 109–116.
- Rombough, P.J., 1988.** Respiratory gas exchange, aerobic metabolism, and effects of hypoxia during early life. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., (Eds.), *Fish Physiology*, vol. XI. Academic Press, San Diego, pp 59-161 (part A).
- Roméo, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Girard, J.P., 2003.** Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ. Pollut.* 122, 369–378.
- Roméo, M., Gharbi-Bouraoui, S., Gnassia-Barelli, M., Dellali, M., Aissa, P., 2006.** Responses of *Hexaplex* (*Murex*) *trunculus* to selected pollutants. *Sci. Total Environ.* 359, 135–144.
- Ross, P.S., Ellis, G.M., Ikonomou, M.G., Barret-Lennards, L.G., Addison, R.F., 2000.** Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 671–679.
- 
- Safe, S., 1993.** Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: Progress and problems. *Environ. Health Perspect.* 100, 259–268.
- Sahu, S.K., Pandit, G.G., 2003.** Estimation of octanol-water partition coefficients for polycyclic aromatic hydrocarbons using reverse-phase HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 26, 135–146.
- Sakka Hlaili, A., Chikhaoui, M.A., El Grami, B., Hadj Mabrouk H., 2003.** Variation hivernoestivale de la communauté phytoplanctonique de la lagune de Bizerte en milieux naturel et fertilisé en nutriments. *Rev. Fac. Sci. Bizerte Tunisia* 2, 37–49.
- Salazar-Coria, L., Amezcua-Allieri, M.A., Tenorio-Torres, M., González-Macías, C., 2007.** Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and metal evaluation after a diesel spill in Oaxaca, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 462–467.

- Salizzato, M., Pavoni, B., Ghirardini, A.V., Ghetti, P.F., 1998.** Sediment toxicity measured using *Vibrio fischeri* as related to the concentrations of organic (PCBs, PAHs) and inorganic (metals, sulphur) pollutants. *Chemosphere* 36, 2949–2968.
- Salomons, W., de Rooij, N.M., Kerdijk, H., Bril, J., 1987.** Sediment as a source for contaminants. *Hydrobiol.* 149, 13–30.
- Salvator, L., 1900.** Bizerte, son passé, son présent et son avenir. Edt. J. Rotschild. Paris. 79 p.
- Sánchez-Nogué, B., Varó, I., Solé, M., 2013.** Comparative analysis of selected biomarkers and pesticide sensitivity in juveniles of *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3480–3488.
- Sanchez, W., Piccini, B., Porcher, J.-M., 2008.** Effect of prochloraz fungicide on biotransformation enzymes and oxidative stress parameters in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *J. Environ. Sci. Health., Part B* 43, 65–70.
- Sarkar, A., Nagarajan, R., Chaphadkar, S., Pal, S., Singbal, S.Y.S., 1997.** Contamination of organochlorine pesticides in sediments from the Arabian Sea along the west coast of India. *Water Res.* 31, 195–200.
- Savinov, V.M., Savinova, T.N., Carroll, J., Mathisov, G.G., Dahle, S., Naes, K., 2000.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of the White Sea, Russia. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 807–818.
- Savinov, V.M., Savinova, T.N., Matishova, G.G., Dahle, S., Naes, K., 2003.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorines (OCs) in bottom sediments of the GubaPechenga, Barents Sea, Russia. *Sci. Total Environ.* 306, 39–56.
- Scheele, J.S., 1998.** A comparison of the concentrations of certain pesticides and polychlorinated hydrocarbons in bone marrow and fat tissue. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 17, 65–68.
- Schnitzler, J.G., Koutrakis, E., Siebert, U., Thomé, J.P., Das, K., 2008.** "Effects of persistent organic pollutants on the thyroid function of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from the Aegean sea, is it an endocrine disruption?" *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1755–1764.
- Schrap, S.M., Opperhuizen, A., 1990.** Relationship between bioavailability and hydrophobicity: reduction of the uptake of organic chemicals by fish due to the sorption on particles. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 715–724.

- Schuurman, H.J., Van Loveren, H., Rozing, J., Vos, J.G., 1992.** Chemicals trophic for the thymus: risk for immunodeficiency and autoimmunity. *Int. J. Immunopharmacol.* 14, 369–375.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M., Imboden, D.M., 2003.** Environmental organic chemistry. Second edition. Hoboken: John Wiley and Sons. 1313 p.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004.** The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392.
- Secco, T., Pellizzato, F., Sfriso, A., Pavoni, B., 2005.** The changing state of contamination in the Lagoon of Venice. Part 1: organic pollutants. *Chemosphere* 58, 279–290.
- Seed, J., Brown, R.P., Olin, S.S., Foran, J.A., 1995.** Chemical mixtures: current risk assessment methodologies and future directions. *Regul. Toxicol. Pharm.* 22, 76–94.
- Segner, H., Braunbeck, T., 1998.** Cellular response profile to chemical stress. In: Schuurmann, G., Markert, B., (Eds.), *Ecotoxicology*. Wiley/Spektrum, New York/Heidelberg. pp 521–569.
- Sellström, U., 1996.** Polybrominated diphenyl ethers in the Swedish environment. Licenciate thesis, ITM-Rapport 1996, 45. Stockholm University, Stockholm, Sweden.
- Serafim, A., Lopes, B., Company, R., Cravo, A., Gomes, T., Sousa, V., Bebianno, M.J., 2011.** A multi-biomarker approach in cross-transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology* 20, 1959–1974.
- Shima, A., Mitani, H., 2004.** Medaka as a research organism: Past, present and future. *Mechanisms of Development* 121, 599–604.
- Simpson, C.D., Mosi, A.A., Cullen, W.R., Reimer, K.J., 1996.** Composition and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in surficial marine sediments from Kitimat Harbor, Canada. *Sci. Total Environ.* 181, 265–278.
- Slooff, W., van Kreijl, C.F., Baars, A.J., 1983.** Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquat. Toxicol.* 4, 1–14.
- Smith, A.G., 1991.** Chlorinated Hydrocarbon Insecticides. In: Hayes, W.J., Lawes, E.R., (Eds.). *Handbook of pesticides toxicology*. Volume 2. Classes of pesticides. Academic Press, San Diego, California, pp 731–915.

- Smolders, R., Bervoets, L., De Boeck, G., Burst, R., 2002.** Integrated condition indices as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. Chem. 21, 87–93.
- Smolders, R., Bervoets, L., Wepener, V., Blust, R., 2003.** A conceptual framework for using mussels as biomonitors in whole effluent toxicity. Hum. Ecol. Risk assess. 9, 741–760.
- Soclo, H.H., Garrigues, P.H., Ewald, M., 2000.** Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. Mar. Pollut. Bull. 40, 387–396.
- Solé, M., Porte, C., Albaigés, J., 1995.** Seasonal variation in the mixed function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Environ. Toxicol. Chem. 14, 157–164.
- Songy, P., Avezard, J., 1963.** Documents pour l'étude des invertébrés (non Arthropodes). Cours de sciences naturelles. Classique Hachette, 84 p.
- Soriano, J.A., Viñas, L., Franco, M.A., Gonzalez, J.J., Ortiz, L., Bayona, J.M., Albaiges, J., 2006.** Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill. Sci. Total Environ. 370, 80–90.
- Soussi, N., 1981.** Mécanisme de la sédimentation et évolution paléogéographique de la lagune de Bizerte (Tunisie) durant le quaternaire récent. Thèse de doctorat. Université Paul Sabatier de Toulouse, France, 229 p.
- Soussi, N., Levy, A., Zaouali, J., 1983.** La lagune de Bizerte: sédimentologie et écologie des foraminifères et mollusques crustacés. Note Serv. Géol. Tunisie, 27–40.
- Standley, L.J., Simoneit, B.R.T., 1987.** Characterization of extractable plant wax, resin and thermally matured components in smoke particles from prescribed burns. Environ. Sci. Technol. 21, 163–169.
- Stapleton, H., Letcher, R.J., Li, J., Baker, J.E., 2004.** Dietary accumulation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers by juvenile carp (*Cyprinus carpio*). Environ. Toxicol. Chem. 23, 1939–1946.
- Stasinakis, A.S., Thomaidis, N.S., Lekkas, T.D., 2001.** Toxicity of organotin compounds to activated sludge. Ecotoxicol. Environ. Saf. 49, 275–280.

- Stefens, J., dos Santos, J.H., Filho, J.G., Peralba Mdo, C., 2007.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Rodrigo de Freitas Lagoon in the urban area of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Environ. Sci. Health. Part A* 42, 399–404.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Forlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1992.** Molecular responses to environmental contamination : enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L., (Eds.), *Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publisher, Chelsea, pp 235–335.
- Stegeman, J.J., Teng, F.Y., Snoyberger, E.A., 1987.** Induced cytochrome P450 in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from coastal Massachusetts evaluated by catalytic assay and monoclonal antibody probes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 1270–1277.
- Stephensen, E., Sturve, J., Förlin, L., 2002.** Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 133, 435–442.
- Stien, X., Risso, C., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Lafaurie, M., 1997.** Effect of copper chloride in vitro and in vivo on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 214–219.
- Storelli, M.M., Barone, G., Santamaría, N., Marcotrigiano, G.O., 2006.** Residue levels of DDTs and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in *Scylliorhinu scanicula* liver from the Mediterranean Sea (Italy). *Mar. Pollut. Bull.* 52, 696–718.
- Storelli, M.M., Marcotrigiano, G.O., 2001.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Ionian Sea, Italy. *Journal of Food Protection* 64, 405–409.
- Strandberg, B.O., Van Bavel, B., Rergqvist, R.A., Broman, D., Ishaq, R., Naf, C., Pettersen, H., Rappe, C., 1998.** Occurrence, sedimentation and spatial variations of organochlorine contaminants in settling particulate matter and sediments in the northern part of the Baltic Sea. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1754–1759.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972.** *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board, Canada Bulletin, Ottawa, 310 p.
- Strmac, M., Oberemm, A., Braunbeck, T., 2002.** Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. *J. Fish Biol.* 61, 24–38.

- Stout, S.A., Uhler, A.D., Emsbo-Mattingly, S.D., 2004.** Comparative evaluation of background anthropogenic hydrocarbons in surficial sediments from mine urban waterways. *Environ. Sci. Technol.* 38, 2987–2994.
- Stumm, W., Morgan, J.J., 1996.** *Aquatic Chemistry*, 3rd ed., Wiley, New York, 1022 p.
- Sturm, A., Wogram, J., Hansen, P.D., Liess, M., 1999.** Potential use of cholinesterase in monitoring low level in organophosphates in small streams: natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 194–200.
- Suárez, P., Ruiz, Y., Alonso, A., San Juan, F., 2013.** Organochlorine compounds in mussels cultured in the Ría of Vigo: Accumulation and origin. *Chemosphere* 90, 7–19.
- Sutherland, J.B., Raffi, F., Kahn, A.A., Cerniglia, C.E., 1995.** Mechanisms of polycyclic aromatic Hydrocarbon degradation. In: Young, L.Y., Cerniglia, C., (Eds.), *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Wiley-Liss, New York, pp 269–306.
- Sunderman, F.W.Jr., Marzouk, A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Reid, M.C., 1985.** Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 15, 229–236.
- Sundberg, H., Ishaq, R., Akerman, G., Tjarnlund, U., Zebuhr, Y., Linderöth, M., Broman, D., Balk, L., 2005.** A bio-effect directed fractionation study for toxicological and chemical characterization of organic compounds in bottom sediment. *Toxicol. Sci.* 84, 63–72.
- Sun, P., Backus, S., Blanchard, P., Hites, R.A., 2006.** Temporal and spatial trends of organochlorine pesticides in Great Lakes precipitation. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2135–2141.
- Swartz, R.C., Deben, W.A., Cole, E.A., 1979.** A bioassay for the toxicity of sediment to marine macrobenthos. *J. Water Pollut. Control Fed* 54, 944–950.
- Swartz, R.C., DeBen, W.A., Sercu, K.A., Lamberson, J.O., 1982.** Sediment toxicity and distribution of Amphipods in Commencement Bay, Washington, USA. *Mar. Pollut. Bull.* 13, 359–364.
- Swartz, R.C., Ditsworth, G.R., Schults, D.W., Lamberson, J.O., 1985.** Sediment toxicity to a marine infaunal amphipod: cadmium and its interaction with sewage sludge. *Mar. Environ. Res.* 18, 133–153.

Swartz, R.C., Kemp, P.F., Schults, D.W., Ditsworth, G.R., Ozretich, R.J., 1989. Acute toxicity of sediment from Eagle Harbor, Washington, to the infaunal amphipod *Rhepoxynius abronius*. Environ. Toxicol. Chem. 8, 215–222.

Swartz, R.C., Kemp, P.F., Schults, D.W., Lamberson, J.O., 1988. Effects of mixtures of sediment contaminants on the marine infaunal amphipod, *Rhepoxynius abronius*. Environ. Toxicol. Chem. 7, 1013–1020.



Tanabe, S., Tatsukawa, R., 1986. Distribution, behaviour and load of PCBs in the oceans. J.S. Waid (ed). PCBs and the environment Vol.1. CRC Press Boca Raton, Florida, pp 143–161.

Tang, Y.X., Zou, M., Lie, H.J., Lie, J.H., 2000. Some features of circulation in the southern Huanghai Sea. Acta Oceanol. Sin. 22, 563–570.

Tapie, N., 2006. Contamination des écosystèmes aquatiques par les PCB et PBDE : Application à l'estuaire de la Gironde. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, France.

Tapie, N., Budzinski, H., Le Menach, K., 2008. Fast and efficient extraction methods for the analysis of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in biological matrices. Anal. Bioanal. Chem. 391, 2169–2177.

Tessier, A., Fortin, D., Belzile, N., DeVitre, R.R., Leppard, G.G., 1996. Metal sorption to diagenetic iron and manganese oxyhydroxides and associated organic matter narrowing the gap between field and laboratory measurements. Geochim. Cosmochim. Acta. 60, 387–404.

Thompson, B., Anderson, B., Hunt, J., Taberski, K., Philips, B., 1999. Relationship between sediment contamination and toxicity in San Francisco Bay. Mar. Environ. Res. 48, 285–310.

Thompson, S., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J.F., 1999. Comparison of PCB and DDT Distribution between Water-column and Sediment-dwelling Bivalves in Arcachon Bay, France. Mar. Pollut. Bull. 38, 655–662.

- Thompson, S., Budzinski, H., LeMenach, K., Letellier, M., Garrigues, P., 2002.** Multi-residue analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorobiphenyls, and organochlorine pesticides in marine sediments. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 196–204.
- Thornton, J., 2000.** Pandoras poison: chlorine health and a new environmental strategy. *Public Health Rep.* 115, 378–381.
- Tolosa, I., Bayona, J.M., Albaigés, J., 1995.** Spatial and temporal distribution, fluxes, and budgets of organochlorinated compounds in northwest Mediterranean sediments. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2519–2527.
- Tolosa, I., Bayona, J.M., Albaigés, J., 1996.** Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons and sulfur/oxygen derivatives in northwestern Mediterranean sediments: spatial and temporal variability, fluxes, and budgets. *Environ. Sci. Technol.* 30, 2495–2503.
- Tolosa, I., Mesa-Albernas, M., Alonso-Hernandez, C.M., 2010.** Organochlorine contamination (PCBs, DDTs, HCB, HCHs) in sediments from Cienfuegos Bay, Cuba. *Mar. Poll. Bull.* 60, 1619–1624.
- Tolosa, I., Readman, J.W., Fowler, S.W., Villeneuve, J.P., Dachs, J., Bayona, J.M., Albaigés, J., 1997.** PCBs in the western Mediterranean. Temporal trends and mass balance assessment. *Deep-Sea Res. II* 44, 907–928.
- Topal, M.H., Wang, J., Levendis, Y.A., Carlson, J.B., Jordan, J., 2004.** PAH and other emissions from burning of J P-8 and diesel fuels in diffusion flames. *Fuel* 83, 2357–2368.
- Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette Jr, L.J., Jegou, B., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Muller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., Skakkebaek, N.E., 1996.** Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 104, 741–803.
- Tortonese, E., 1975.** Fauna d'Italia. Calderini Ed., Bologna, 3, 290–341.
- Trabelsi, S., Driss, M.R., 2005.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial coastal sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 344–359.
- Tronczyński, J., Munschy, C., Héas-Moisán, K., Guiot, N., Truquet, I., Olivier, N., Men, S., Furaut, A., 2004.** Contamination of the Bay of Biscay by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) following the T/V “Erika” oil spill. *Aquat. Living Resour.* 17, 243–259.

- Turcotte, D., Akhtar, P., Bowerman, M., Kiparissis, Y., Brown, R.S., Hodson, P.V., 2011.** Measuring the toxicity of alkyl-phenanthrenes to early life stages of medaka (*Oryzias latipes*) using partition-controlled delivery. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 487–895.
- Turgeon, D.D., Quinn, J.F., Bogan, A.E., Coane, V., Hochberg, F.G., Lyon, W.G., 1998.** Noms communs et scientifiques des invertébrés aquatiques des Etats-Unis et Canada : Mollusque, 2^{ème} ED. Publication spéciale 26 de Société Américaine de pêche. Société Américaine de pêche. Bethesda, Le Maryland, Etats-Unis. 526, ISBN/ 1-888569-01-8.
- Turkmen, A., Turkmen, M., Tepe, Y., Akyurt, I., 2005.** Heavy metals in three commercially valuable fish species from Iskenderun Bay, Northern East Mediterranean Sea, Turkey. *Food Chem.* 91, 167–172.
- Tyler, A.O., Millward, G.E., 1996.** Distribution and partitioning of polychlorinated dibenzo-p-dioxines, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in the Humber estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 397–403.



- UE, 2001.** Décision n°2455/2001/CE du Parlement européen et du Conseil du 20 novembre 2001 établissant la liste des substances prioritaires dans le domaine de l'eau et modifiant la directive 2000/60/CE.
- Uguz, C., Iscan, M., Ergüven, A., Isgor, B., Togan, I., 2003.** The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Environ. Res.* 92, 262–270.
- UNECE, 1998.** Aarhus Convention (Convention on Access to Information, Public Participation in Decision-making and Access to Justice in Environmental Matters). <http://www.unece.org/env/pp>.
- UNEP, 2001.** Stockholm convention on persistent organic pollutants, as amended 2009. Geneva, Switzerland.
- UNEP, 2009.** Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants Fourth Meeting. UNEP/POPS/COP.4/1.

- Ünlü, S., Alpar, B., 2009. Evolution of potential ecological impacts of the bottom sediment from the gulf of Gemlik; Marmara Sea, Turkey. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 83, 903–906.
- U.S. Department of Health and Human Services/Public Health Service/National Toxicology Program (DHHS/PHS/NTP), 2005. In: Report on Carcinogens. 11th ed.. Trichloroethylene; U.S. DHHS/PHS/NTP. Washington, DC, pp 261–263.
- US EPA, 1980. Ambient Water Quality Criteria for Polychlorinated Biphenyls, Report No. EPA-440/5-80-068, National Technical Information Service, Springfield, VA.
- US EPA, 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal. EPA-503/8-91-001.
- US EPA, 1997. Mercury study report to Congress. Vols I–VIII. EPA 452/R-97-003. US Environmental Protection Agency, Washington.
- US EPA, 1999. Compendium of methods for the determination of toxic organic compounds in ambient air. Second edition. Compendium method TO-13A.
- US EPA, 2002. Fish life-cycle test guideline – Draft detailed review paper on a fish two-generation toxicity test, U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T), 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460, 133 p.



- Vaccaro, E., Meucci, V., Intorre, L., Soldani, G., Di Bello, D., Longo, V., Gervasi, P.G., Pretti, C., 2005. Effects of 17 β -estradiol, 4-nonylphenol and PCB 126 on the estrogenic activity and phase 1 and 2 biotransformation enzymes in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquat. Toxicol. 75, 293–305.
- Van-Birgelen, A.P.J.M., 1998. Hexachlorobenzene as a possible major contributor to the dioxin activity of human milk. Environ. Health Persp. 106, 683–688.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., Peterson, R.E., 2006. The 2005 world health organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for Dioxins and Dioxin-like compounds. Toxicol. Sci. 93, 223–241.

- Van den Brink, N.W., Bosveld, B.T.C., 2001.** PCB concentrations and metabolism patterns in common terns (*Sterna hirundo*) from different breeding colonies in The Netherlands. Mar. Pollut. Bull. 42, 280–285.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57–149.
- Van der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1996.** Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollutioninduced biochemical responses. Aquat. Toxicol. 36, 189–222.
- Van der Oost, R., Heida, H., Opperhuizen, A., Vermeulen, N.P.E., 1991.** Bioaccumulation of organic micropollutants in different aquatic organisms: sublethal toxic effects on fish. In: Mayes, M.A., Baron, M.G., (Eds.), Aquatic Toxicology and Risk Assessment: 14th Vol. ASTM STP 1124. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp 166–180.
- Van der Oost, R., Van Gastel, L., Worst, D., Hanraads, M., Satumalay, K., Van Schooten, F.-J., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1994.** Biochemical markers in feral roach (*Rutilus rutilus*) in relation to the bioaccumulation of organic trace pollutants. Chemosphere 29, 801–817.
- Van Ginneken, V., Palstra, A., Leonards, P., Nieveen, M., van den Berg, H., Flik, G., Spanings, T., Niemantsverdriet, P., van den Thillart, G., Murk, A., 2009.** "PCBs and the energy cost of migration in the European eel (*Anguilla anguilla* L.)." Aquat. Toxicol. 92, 213–220.
- Van Leeuwen, J. A., Waltner-Toews, D., Abernathy, T., Smit, B., Shoukri, M., 1999.** Associations between stomach cancer incidence and drinking water contamination with atrazine and nitrate in Ontario (Canada) agroecosystems, 1987-1991. Int. J. Epidemiol. 28, 836–840.
- Van Metre, P.C., Mahler, B.J., 2005.** Trends in Hydrophobic Organic Contaminants in Urban and Reference lake Sediments across the United States, 1970-2001. Environ. Sci. Technol. 39, 5567–5574.
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003.** Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. Environ. Int. 28, 711–717.
- Veith, G.D., Defoe, D.L., Bergstedt, B.J., 1979.** Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish. J. Fish. Res. Bd. Can. 36, 1040–1048.

- Vetter, W., Stoll, E., Garson, M.J., Fahey, S.J., Gaus, C., Muller, J.F., 2002.** Sponge halogenated natural products found at parts-per million levels in marine mammals. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2014–2019.
- Vicquelin, L., Leray-Forget, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Deflandre, B., Anschutz, P., Etcheber, H., Morin, B., Budzinski, H., Cachot, J., 2011.** A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 105, 235–245.
- Villeneuve, J.-P., Carvalho, F.P., Fowler, S.W., Cattini, C., 1999.** Levels and trends of PCBs, chlorinated pesticides and petroleum hydrocarbons in mussels from the NW Mediterranean coast: comparison of concentrations in 1973/1974 and 1988/1989. *Sci. Total Environ.* 237, 57–65.
- Viñas, L., Angeles Franco, M., Antonio Soriano, J., José González, J., Pon, J., Albaigés, J., 2010.** Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Spanish northern continental shelf. Assessment of spatial and temporal trends. *Environ. Pollut.* 158, 1551–1560.
- Voorspoels, S., Covaci, A., Maervoet, J., De Meester, I., Schepens, P., 2004.** Levels and profiles of PCBs and OCPs in marine benthic species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 393–404.



- Walker, C.H., 1995.** Biochemical biomarkers in ecotoxicology—some recent developments. *Sci. Total Environ.* 171, 189–195.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 1996.** *Principles of Ecotoxicology.* Taylor & Francis, New York, NY, USA.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2001.** *Principles of Ecotoxicology.* Taylor and Francis, London.
- Walker, C.H., Livingstone, D.R., 1992.** *Persistent Pollutants in Marine Ecosystems.* Pergamon Press, Oxford, 272 p.
- Walker, K., 2000.** Cost-comparison of DDT and alternative insecticides for malaria control. *Med. Vet. Entomol.* 14, 345–354.

- Wammer, K.H., Peters, C.A., 2005.** Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation rates: a structure-based Study. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2571–2578.
- Wang, J.S., 1998.** Accumulation and depuration of aqueous and dietary PCB (Aroclor 1254) by striped bass. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 104–111.
- Wang, Z., Fingas, M., Page, D.S., 1999.** Oil spill identification. *J. Chromatogr. A* 843, 369–411.
- Wang, Z., Ma, X., Lin, Z., Na, G., Yao, Z., 2009.** Congener specific distributions of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sediment and mussel (*Mytilus edulis*) of the Bo Sea, China. *Chemosphere* 74, 896–901.
- Wania, F., Mackay, D., 1996.** Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 30, 390A–396A.
- Wan, Y., Jones, P.D., Wiseman, S., Chang, H., Chorney, D., Kannan, K., Khim, J.S., Tanabe, S., Lam, M.H.W., Giesy, J.P., 2010.** Contribution of anthropogenic and naturally occurring organobromine compounds to bromine mass in marine organisms. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6068–6073.
- Warwick, R., 2005.** Taxonomic distinctness as an indicator of stress in the marine macrobenthos. *Indicators of stress in the marine benthos*, IOC workshop report No. 195, pp 10–11.
- Wassenberg, D.M., Di Giulio, R.T., 2004.** Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. *Environ. Health. Perspect.* 112, 1658–1664.
- Wassenberg, D.M., Nerlinger, A.L., Battle, L.P., Di Giulio, R.T., 2005.** Effects of the polycyclic aromatic hydrocarbon heterocycles, carbazole and dibenzothiophene, on in vivo and in vitro CYP1A activity and polycyclic aromatic hydrocarbon-derived embryonic deformities. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2526–2532.
- Watanabe, I., Sakai, S.I., 2003.** Environmental release and behavior of brominated flame retardants. *Environ. Int.* 29, 665–682.
- Watanabe, I., Tatsukawa, R., 1989.** Anthropogenic brominated aromatics in the Japanese environment. *Proceedings, Workshop on Brominated Aromatic Flame Retardants*, Swedish National Chemicals Inspectorate. Solna, Sweden, 24-26 October 1989, pp 63–71.
- Weisskopf, M.G., Knekt, P., O'Reilly, E.J., Lyytinen, J., Reunanen, A., Laden, F., Altshul, L., Ascherio, A., 2010.** Persistent organochlorine pesticides in serum and risk of Parkinson disease. *Neurology* 74, 1055–1061.

- Wenning, R.J., 2005.** Use of Sediment Quality Guidelines and Related Tools for the Assessment of Contaminated Sediments: Proceedings from the Pellston Workshop on Use of Sediment Quality Guidelines and Related Tools for the Assessment of Contaminated Sediments, 18-22 August 2002, Fairmont, Montana, USA. SETAC Society.
- Wenzel, K., Manz, M., Hubert, A., Schuurmann, G., 2002.** Fate of POPs (DDX, HCHs, PCBs) in upper soil layers of pine forests. *Sci. Total Environ.* 286, 143–154.
- Whaley, D.A., Keyes, D., Khorrami, B., 2001.** *Drug. Chem. Toxicol.* 24, 359–420.
- WHO, 1994.** Environment Health Criteria. Brominated diphenyl ethers. International program on chemical safety. Geneva, Switzerland: World Health Organisation.
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.D., 2000.** Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 347–570.
- Wild, S.R., Jones, K.C., 1995.** Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: A preliminary and budget. *Environ. Pollut.* 88, 91–108.
- Wilcke, W., 2000.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soils-A review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163, 229–248.
- Wing, M.R., Bada, J.L., 1992.** The origin of polycyclic aromatic hydrocarbons in meteorites. *Origins Life Evol. Biosphere* 21, 375–383.
- Wittbrodt, J., Shima, A., Scharl, M., 2002.** Medaka—a model organism from the far east. *Nat. Rev. Genet.* 3, 53–63.
- Wolff, E.W., Peel, D.A., 1994.** Assessing global and local pollution for heavy metals in Antarctica. *Anal. Mag.* 22, 41–43.
- Wong, C.K.C., Cheung, R.Y.H., Wong, M.H., 1999.** Toxicological assessment of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate, *Dunaliella tertiolecta*. *Environ. Pollut.* 105, 175–183.
- Woodiwiss, F.S., 1964.** The biological system of stream classification used by the Trent River Board. *Chem. Indust.* 11, 443–447.
- Wu, L., Chen, L., Hou, J., Zhang, Y., Zhao, J., Gao, H., 2009.** Assessment of Sediment Quality of Yangtze River Estuary Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Environ. Toxicol.* 25, 234–242.
- Wu, M., Chaudhary, A., Khan, I.A., Dasmahapatra, A.K., 2008.** Ethanol teratogenesis in Japanese Medaka: Effects at the cellular level. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 149, 191–201.

- Wu, R.S.S., Pollino, C.A., Au, D.W.T., Zheng, G.J., Yuen, B.B.H., Lam, P.K.S., 2003.** Evaluation of biomarkers of exposure and effect in juvenile areolated grouper (*Epinephelus areolatus*) on foodborne exposure to benzo[a]pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1568–1573.
- Wu, S.-C., Gschwend, P.M., 1986.** Sorption kinetics of hydrophobic organic compounds to natural sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* 20, 717–725.
- Wu, Y., Zhang, J., Mi, T.-Z., Li, B., 2001.** Occurrence of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the core sediments of the Yellow Sea. *Mar. Chem.* 76, 1–15.



- Xia, X., Wang, R., 2008.** Effect of sediment particle size on polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation: importance of the sediment–water interface. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 119–125.
- Xue, W., Warshawsky, D., 2005.** Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 73–93.



- Yamaguchi, S., Miura, C., Ito, A., Agusa, T., Iwata, H., Tanabe, S., Tuyen, B.C., Miura, T., 2007.** Effects of lead, molybdenum, rubidium, arsenic and organochlorines on spermatogenesis in fish: Monitoring at Mekong Delta area and in vitro experiment. *Aquat. Toxicol.* 83; 43–51.
- Yamamoto, T., 1975.** Medaka (Killifish): Biology and Strains, in Yamamoto, T., (ed.). Keigaku Pub. Co., Tokyo. 365 p. <http://www.bio.nagoya-u.ac.jp:8000/Yamabook.html>.
- Yang, G.P., 2000.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the South China Sea. *Environ. Pollut.* 108, 163–171.

- Yang, S.K., 1988.** Stereoselectivity of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem. Pharmacol.* 37, 61–70.
- Yang, Y., Griffiths, W.J., Midtvedt, T., Sjøvall, J., Rafter, J., Gustafsson, J.A., 1999.** Characterization of conjugated metabolites of benzo[a]pyrene in germ-free rat urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1182–1189.
- Yang, Z.F., Shen, Z.Y., Gao, F., Tang, Z.W., Niu, J.F., 2009.** Occurrence and possible sources of polychlorinated biphenyls in surface sediments from the Wuhan reach of the Yangtze River, China. *Chemosphere* 74, 1522–1530.
- Yang, Z., Yang, J.X., 2004.** Effect of photoperiod on the embryonic development of obscure puffer (*Takifugu obscurus*). *J. Freshwat. Ecol.* 19, 53–58.
- Yan, W., Chi, J.S., Wang, Z.Y., Huang, W.X., Zhang, G., 2009.** Spatial and temporal distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments from Daya Bay, South China. *Environ. Pollut.* 157, 1823–1830.
- Yao, Z.L., Lai, Q.F., Zhou, K., Rizalita, R.E., Wang, H., 2010.** Developmental biology of medaka fish (*Oryzias latipes*) exposed to alkalinity stress. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 397–402.
- Yokota, H., Seki, M., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Honjo, T., Kabayashi, K., 2001.** Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2552–2560.
- Young, T.M., Weber, W.J.Jr., 1995.** A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 3. Effects of diagenetic processes on sorption energetics. *Environ. Sci. Technol.* 29, 92–97.
- Yuan, D., Yang, D., Wade, T.L., Qian, Y., 2001.** Status of persistent organic pollutants in the sediments from several estuaries in China. *Environ. Pollut.* 114, 101–111.
- Yum, S., Woo, S., Kagami, Y., Park, H.-S., Ryu, J.-C., 2010.** "Changes in gene expression profile of medaka with acute toxicity of Arochlor 1260, a polychlorinated biphenyl mixture." *Comparative Biochemistry and Physiology. Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol.* 151, 51–56.
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S., 2002.** PAHs in the Fraser river basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH sources and composition. *Org. Geochem.* 33, 489–515.



- Zaghden, H., Kallel, M., Elleuch, B., Oudot, J., Saliot, A., 2007.** Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments of Sfax, Tunisia, Mediterranean Sea. *Mar. Chem.* 105, 70–89.
- Zakaria, M.P., Takada, H., Tsutsumi, S., Ohno, K., Yamada, J., Kouno, E., Kumata, H., 2002.** Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rivers and estuaries in Malaysia: A widespread input of petrogenic PAHs. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1907–1918.
- Zaouali, J., 1974.** Les peuplements dans les biocoenoses lagunaires tunisiennes. Etude de la biologie de l'espèce pionnière *Cerastoderma glaucum* Poiret. Thèse de Doctorat, University de Caen, France.
- Zaouali J., 1993.** Les peuplements benthiques de la petite Syrte, golfe de Gabès- Tunisie. Résultats de la campagne de prospection du mois de juillet 1990. Etude préliminaire: biocénose et thanatocénose récentes. *Mar. Life* 3, 47–60.
- Zarcinas, B.A., Rogers, S.L., 2002.** Copper, lead and zinc mobility and bioavailability in a river sediment contaminated with paint stripping residue. *Environ. Geochem. Health* 24, 191–203.
- Zeng, E.Y., Vista, C.L., 1997.** Organic pollutants in the coastal environment off San Diego, California. 1. Source identification and assessment by compositional indices of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 179–188.
- Zepp, R.G., Schlotzhauer, P.F., 1979.** Photoreactivity of selected aromatic hydrocarbons in water. In: Jones, P.W., Leber, P., (Eds.), *Polynuclear aromatic hydrocarbons*. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI, pp 141–158.
- Zha, J., Wang, Z., 2006.** Acute and early life stage toxicity of industrial effluent on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Sci. Total Environ.* 357, 112–119.
- Zhang, G., Min, Y.S., Mai, B.X., Sheng, G.Y., Fu, J.M., Wang, Z.S., 1999.** Time trend of BHCs and DDTs in a sedimentary core in Macao estuary, southern China. *Mar. Pollut. Bull.* 39, 326–330.
- Zhang, J.F., Wang, X.R., 2003.** Effects of longer-term exposure of low-level 2,4-dichlorophenol on the antioxidant defense system in liver of *Carassius auratus*. *Environ. Sci.* 24, 136–140.

- Zhang, P., Song, J., Liu, Z., Zheng, G., Zhang, N., He, Z., 2007.** PCBs and its coupling with eco-environments in Southern Yellow Sea surface sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1105–1115.
- Zhang, X.L., Tao, S., Liu, W.X., Yang, Y., Zuo, Q., Liu, S.Z., 2005.** Source of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Based on Species Ratios : A Multimedia Approach. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9109–9114.
- Zhang, Z., Hu, J., Zhen, H., Wu, X., Huang, C., 2008.** Reproductive inhibition and transgenerational toxicity of triphenyltin on medaka (*Oryzias latipes*) at environmentally relevant levels. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8133–8139.
- Zhang, Z.L., Huang, J., Yu, G., Hong, H.S., 2004.** Occurrence of PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the Tonghui River of Beijing, China. *Environ. Pollut.* 130, 249–261.
- Zhao, L., Hou, H., Zhou, Y., Xue, N., Li, H., Li, F., 2010.** Distribution and ecological risk of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in surficial sediments from Haihe river and Haihe Estuary Area, China. *Chemosphere* 78, 1285–1293.
- Zhou, J.L., Rowland, S.J., 1997.** Evaluation of the interactions between hydrophobic organic pollutions and suspended particles in estuarine waters. *Water Res.* 31, 1708–1718.
- Zonta, R., Botter, M., Cassin, D., Pini, R., Scattolin, M., Zaggia, L., 2007.** Sediment chemical contamination of a shallow water area close to the industrial zone of Porto Marghera (Venice Lagoon, Italy). *Mar. Pollut. Bull.* 55, 529–542.
- Zrafi-Nouira, I., Khedir-Ghenim, Z., Zrafi, F., Bahri, R., Cheraeif, I., Rouabhia, M., Saidane-Mosbahi, D., 2008.** Hydrocarbon Pollution in the Sediment from the Jarzouna-Bizerte Coastal Area of Tunisia (Mediterranean Sea). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 566–572.
- Zimmer, M., Ahlf, W., 1993.** Erarbeitung von Kriterien zur Ableitung von Qualitätszielen für Sedimente und Schwebstoffe. Literaturstudie UBA.

Résumé

L'objectif de cette thèse est le diagnostic de l'état de santé de la lagune de Bizerte par une approche multi-marqueurs (chimique, biochimique et morphométrique) et multi-compartiments (sédiment et biote). Pour atteindre cet objectif, les modèles biologiques choisis sont la moule *Mytilus galloprovincialis* et le poisson gobie *Zosterisessor ophiocephalus*. Ces deux espèces sont largement répandues dans la lagune de Bizerte et la mer Méditerranée. Dans une première partie et afin d'estimer les niveaux de contamination de la lagune de Bizerte par les polluants organiques persistants (POPs), des analyses chimiques, granulométriques et minéralogiques (COT) de sédiments superficiels ont été réalisées. Par la suite la toxicité potentielle des sédiments a été évaluée par une batterie de bioessais. Dans une troisième partie la biodisponibilité et l'impact écotoxicologique des POPs étudiés ont été évalués par l'accumulation de ces contaminants au niveau des deux organismes indicateurs choisis et l'étude des réponses biologiques associées à travers quelques biomarqueurs tels que la catalase (CAT), l'acide thiobarbiturique (TBARS); l'Ethoxyrésorufine O-dééthylase (EROD); la glutathion-S-transférase (GST) et l'acétylcholinestérase (AChE). Les principaux résultats des analyses chimiques révèlent une contamination générale des sédiments et organismes étudiés par les POPs. Les niveaux de contamination sont fonction de l'espèce et de la station étudiée. La comparaison de nos valeurs avec les données de la littérature a montré que les niveaux de contamination de la lagune sont similaires ou légèrement inférieurs à ceux enregistrés dans des écosystèmes équivalents dans d'autres pays du monde. L'estimation de la toxicité des sédiments au moyen des valeurs guides sédimentaires (ERL, ERM, TEL et PEL) et trois tests biologiques (Microtox[®], SOS-Chromotest[®] et test MELA) ont montré que les sédiments des stations du canal de Bizerte S1 et S3 représentent un danger accru pour les organismes aquatiques. Nos résultats ont montré que les biomarqueurs mesurés chez les deux espèces choisies sont des paramètres sensibles et inductibles permettant de qualifier l'état de santé des organismes et la qualité globale du milieu étudié. Les marqueurs morphométriques contrairement aux marqueurs biochimiques n'ont pas permis de discriminer les différents sites étudiés. Contrairement aux poissons, il a été démontré chez les moules que les facteurs abiotiques ont une influence sur les concentrations en POPs et les réponses des biomarqueurs.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, il apparaît que cette approche intégrative associant des mesures chimiques et écotoxicologiques représente un bon moyen pour évaluer la qualité de l'environnement notamment dans le cadre de programmes de biosurveillance.

Mots-clés: Biosurveillance, polluants organiques persistants, biodisponibilité, bioessais, gobie, moule méditerranéenne, espèces sentinelles, biomarqueurs, Lagune de Bizerte.

Abstract

The objective of this thesis was the diagnosis of the health status of the Bizerte lagoon using a multi-marker (chemical, biochemical and morphometric) and multi-compartment approach (sediment and biota). To achieve this objective, the selected biological models were the mussel *Mytilus galloprovincialis* and the goby fish *Zosterisessor ophiocephalus*. Both species are widespread in the Bizerte lagoon and the Mediterranean Sea. In a first part and in order to estimate the levels of contamination of the Bizerte lagoon, persistent organic pollutant (POPs), granulometric and mineralogical (TOC) analyses of surficial sediments were carried out. Afterwards, the potential toxicity of sediments was assessed by a battery of bioassays. In a the third part, bioavailability and ecotoxicological impact of POPs studied were assessed by bioaccumulation measurement in these two indicators species, and the study of biological responses associated through a battery of biomarkers such as catalase (CAT), thiobarbituric acid (TBARS); Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD); glutathione-S-transferase (GST) and acetylcholinesterase (AChE). The main results of the chemical analyses show a general contamination of sediments and organisms studied by POPs. Contamination levels are dependent on the studied species and stations. Comparing our values with literature data, showed that the levels of contamination of the lagoon are similar or slightly lower than equivalent ecosystems in other parts of the world. Besides, the estimation of sediment toxicity, using sediment guideline values (ERL, ERM, TEL et PEL), as well as bioassays (Microtox[®], SOS-Chromotest[®] and MELA test) showed that stations of canal of Bizerte S1 and S3 were associated with an increased hazard to aquatic organisms. Our results showed that biomarkers measured in both selected species are sensitive and inducible parameters, which allowed to characterize the health status of organisms and global quality of the studied environment. Biochemical but not morphometric markers allowed to discriminate the different studied sites according to chemical risk. Unlike fish, it has been demonstrated in mussels that abiotic factors influence the concentrations of POPs and biomarker responses.

Obtained data suggest that integrative approach, combining chemical and ecotoxicological measurements, may represent a good way to asses the quality of the environment, particularly, in the context of biomonitoring programs.

Keywords: Biomonitoring, persistent organic pollutants, bioavailability, bioassays, goby, Mediterranean mussel, sentinel species, biomarkers, Bizerte lagoon.
